



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL DEL ESTADO DE SONORA
DR ERNESTO RAMOS BOURS

T E S I S

**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL BIOMARCADOR PD-L1 Y LOS
PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS EN CASOS DE MELANOMA DE PIEL
EN EL HOSPITAL GENERAL DEL ESTADO “DR. ERNESTO RAMOS BOURS”**

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:
Alfredo López Turnbull

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. David Romo Montaña

Hospital General del Estado de Sonora, servicio de anatomía patológica

COMITÉ TUTOR: Dra. María Esther Salvatierra de Aranguren

Hospital General del Estado de Sonora, servicio de anatomía patológica

Dr. Luis Roberto Olivas Román

Hospital General del Estado de Sonora, servicio de anatomía patológica

M. en C. Nohelia G. Pacheco

Hospital General del Estado de Sonora

Hermosillo Sonora; 16 de junio de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



GOBIERNO
DE SONORA
SERVICIOS DE SALUD
DE SONORA



HOSPITAL GENERAL
DE ESPECIALIDADES
DEL ESTADO DE SONORA

SERVICIOS DE SALUD DE SONORA
HOSPITAL GENERAL DE ESPECIALIDADES
DEL ESTADO DE SONORA
División de Enseñanza e Investigación

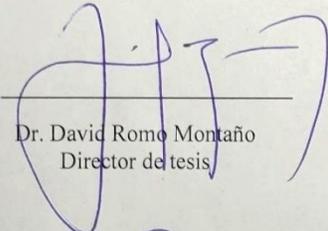
DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN ÁREA DE INVESTIGACIÓN
FORMATO AIC 06 VOTO APROBATORIO DE CADA MIEMBRO DEL COMITÉ DE
TESIS

Hermosillo Sonora a 16 de junio de 2023

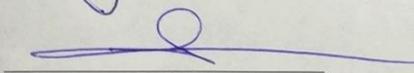
DR. JOSÉ FRANCISCO LAM FÉLIX
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN HOSPITAL GENERAL
DEL ESTADO DE SONORA

A/A: COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Por medio de la presente hacemos constar que hemos revisado el trabajo del médico residente Alfredo López Turnbull de la especialidad de Anatomía patológica. Una vez revisado el trabajo y tras la evaluación del proyecto por medio de seminarios hemos decidido emitir nuestro voto aprobatorio para que el sustentante presente su investigación en su defensa de examen y pueda continuar con su proceso de titulación para obtener su grado de médico especialista.


Dr. David Romo Montaña
Director de tesis


Dr. Luis Roberto Olivas Román
Asesor de tesis


M. en C. Nohelia G. Pacheco
Asesor de tesis



DEDICATORIA

A mis padres que me han motivado y apoyado para lograr todos los objetivos que me he trazado, gracias por estar siempre a mi lado, no habría podido estar aquí si no fuera por ellos.

A mis asesores de tesis y maestros, Dr. Romo, Dr. Olivas, Dra. Salvatierra y Mtra. Nohelia, por su gran atención, apoyo y paciencia a lo largo de estos años y sobre todo el tiempo invertido en mí.

A mis compañeros de patología que estuvieron a mi lado tanto en las buenas como en las malas, dentro y fuera del hospital, Alberto Segoviano, Fernando Guevara, Cesar Angulo (R+ y actualmente adscrito), mi CoR Lizeth, así como a los más nuevos residentes Alexis, Yaneth, Constanza y Roberto.

A todo el servicio de patología que día a día están con compartiendo experiencias, Sary, Marylolis, Sandra, Natalia, Cinthya. En especial al químico Omar Ríos por apoyarme en la tesis de la cual forma parte, además de su gran amistad.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
MARCO TEÓRICO	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	43
LITERATURA CITADA	44
ANEXOS.....	47

RESUMEN

El melanoma es el cáncer de piel más agresivo, en México se registraron 195,499 nuevos casos de cáncer en el 2020, de los cuales 2,051 casos fueron de melanoma que representa el 1% de todos los cánceres registrados con una mortalidad de 773 casos. El PD-L1 es un ligando afín de PD-1, que podría inhibir las respuestas de las células T y servir como un mecanismo potencial para que el tumor escape de la vigilancia inmunológica. Se ha observado la expresión de PD-L1 en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL's) y células tumorales en múltiples tipos de neoplasias malignas. Actualmente se están realizando estudios para determinar su valor pronóstico.

Objetivo general: Determinar la correlación de la expresión de PD-L1 y el subtipo histológico, la estadificación histopatológica de Breslow/Clark y el TIL's en casos de pacientes con diagnóstico de melanoma en el Hospital General del Estado de Sonora.

Metodología: Se realizó el presente estudio en 25 casos del Hospital General del estado de Sonora diagnosticados con melanoma en el periodo comprendido entre el 01 de enero 2016 a 31 de diciembre 2021. Se revisaron laminillas en hematoxilina y eosina (H&E), registraron los subtipos histológicos, estadificación histopatológica de Breslow/Clark, TIL's y se efectuó inmunotinción con PD-L1.

Resultados: La edad media de presentación fue de 63 años, la media de tamaño fue de 2.5 cm de tamaño y el subtipo histológico más frecuente fue el nodular con 9 casos.

Conclusión: La expresión de PD-L1 no tuvo una relación estadísticamente significativa con las variables estudiadas: subtipo histológico, estadificación histopatológica de Breslow/Clark y el TIL's.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de piel representa un problema de salud pública, siendo el melanoma el más agresivo de ellos, en México se registraron 195,499 nuevos casos de cáncer en el 2020, de los cuales 2,051 casos fueron de melanoma, que representa el 1% de todos los cánceres registrados con una mortalidad del 37%. El diagnóstico oportuno del melanoma es de suma importancia ya que mejora el pronóstico y su tratamiento es menos agresivo; el retraso de este complica el tratamiento reduciendo la supervivencia global de los pacientes que lo padecen. Los subtipos histológicos del melanoma son múltiples, cada uno con sus características específicas, en México el subtipo con mayor incidencia es el lentiginoso acral, el cual tiende a no estar relacionado con la exposición a la luz o radiación UV como la gran mayoría de sus otras variantes, su comportamiento disímil motivó la realización de este estudio para obtener más información sobre nuestros pacientes.

El ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1) es un ligando afín de muerte celular programada 1 (PD-1), que podría inhibir las respuestas de las células T y servir como un mecanismo potencial para que el tumor escape de la vigilancia inmunológica.

Se ha observado la expresión de PD-L1 en células inmunes y tumorales en múltiples tipos de neoplasias malignas como cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal de células claras, cáncer gástrico, ovárico, por mencionar algunos. Actualmente se están realizando estudios para determinar su valor pronóstico en el melanoma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer de piel de tipo melanoma es una neoplasia inmunogénica, no obstante, el melanoma primario suele ser tratado con resección quirúrgica, a pesar de eso los casos de melanoma metastásico siguen siendo un problema de salud, ya que son sumamente agresivos y continúa siendo una enfermedad de mal pronóstico en estadios avanzados, es por eso que se justifica la búsqueda de un tratamiento sistémico. (Xu et al, 2020)

Actualmente, en los últimos años ha habido publicaciones con resultados controversiales en cuanto a la relación de la expresión del PD-L1 y la sobrevida general. A pesar de esto no se ha integrado una visión global y comprensiva sobre la eficacia y precisión de la expresión del biomarcador y los parámetros histológicos del melanoma. (Xu et al, 2020)

El inmunomarcador de muerte celular programada 1 (PD-1) es un ligando afín al PD-L1, el cual puede inhibir la respuesta de las células T y funcionar como un potencial mecanismo de escape por parte del tumor a la vigilancia inmunológica. La expresión de PD-L1 se ha observado en TIL's y en células tumorales en múltiples tipos de neoplasias malignas, incluyendo: cáncer de mama, pulmón, próstata y gástrico. Estudios previos han sugerido que la expresión de PD-L1 se ha asociado con un peor pronóstico en las neoplasias malignas antes mencionadas, sin embargo, el potencial valor pronóstico de PD-L1 en melanoma sigue siendo dudoso. Se han realizado estudios que demuestran que la expresión de PD-L1 es mayor en melanomas metastásicos que en melanomas primarios. (Xu et al, 2020)

Dada la eficacia de los fármacos antiPD-1/PD-L1, un número creciente de pacientes con melanoma son tratados con inhibidores como Pembrolizumab y Nivolumab (Salmaninejad et al., 2018). Actualmente los debates se centran en el umbral de tinción PD-1/PD-L1 para

seleccionar pacientes que pueden beneficiarse más de terapia anti-PD-L1. En el futuro, los estudios adicionales deben aumentar el tamaño de la muestra y los períodos de seguimiento para confirmar el valor pronóstico de PD-L1 en melanoma. (Xu et al, 2020)

Una de las características del Hospital General del Estado de Sonora, dentro de sus múltiples funciones, es la concentración de casos oncológicos como melanoma en estadios avanzados, lo cual nos permite y motiva a realizar por primera vez el estudio de la expresión del PD-L1 en los casos con diagnóstico de melanoma, a fin de conocer la relación de dicho ligando con los subtipos histológicos, estadificación histopatológica de Breslow/Clark y TIL's en estas lesiones y sirva como antecedente para la detección de casos con potencial respuesta a inmunoterapia.

¿Existe una relación entre la expresión de PD-L1 y los subtipos histológicos, estadificación histopatológica de Breslow/Clark y TIL's en casos diagnosticados de melanoma en el Hospital General del Estado de Sonora?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la correlación de la expresión de PD-L1 y el subtipo histológico, la estadificación histopatológica de Breslow/Clark y el TIL's en casos de pacientes con diagnóstico de melanoma en el Hospital General del Estado de Sonora.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir las características clínico-patológicas de casos con diagnóstico de melanoma con relación a su expresión de PD-L1.
2. Analizar la relación de la estadificación histopatológica de Breslow/Clark de casos con diagnóstico de melanoma agrupadas por expresión de PD-L1.
3. Analizar la relación del TIL's de casos con diagnóstico de melanoma agrupadas por expresión de PD-L1.
4. Relacionar los casos con diagnóstico de melanoma de acuerdo con el grado de expresión de PD-L1 en células tumorales.

MARCO TEÓRICO

El cáncer de piel más agresivo es melanoma (Hernandez-Domínguez, y otros, 2018). Lo podemos definir como un tumor maligno de piel que se origina en los melanocitos (células productoras de pigmento) de origen neuroectodérmico. (Castañeda Gameros & Eljure Téllez, 2016). Además de la piel, el melanoma puede afectar otros sitios, pero estos son menos comunes y no se consideran “cutáneos” tales como ojo, cerebro, mucosa oral, área nasofaríngea, lecho ungueal y mucosa anal. (Campoli & High, 2019)

Según las últimas estadísticas mundiales del GLOBOCAN 2020, se registraron 324,635 nuevos casos y 57,043 muertes por melanoma.

En México se registraron 195,499 nuevos casos de cáncer en el 2020, de los cuales 2,051 casos fueron de melanoma que representa el 1% de todos los canceres registrados con una mortalidad de 773. (Observatory, 2020)

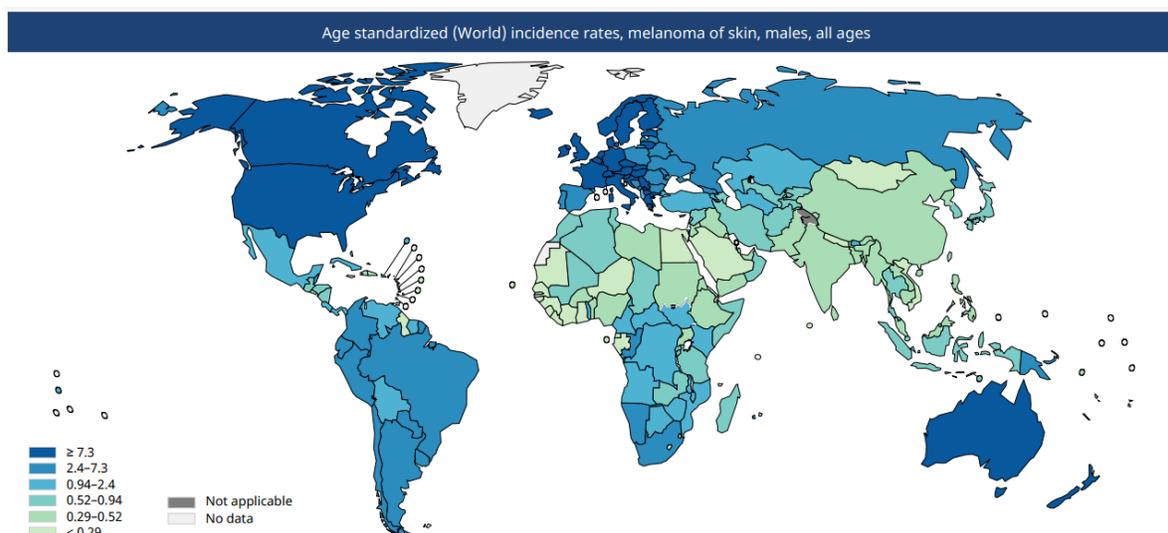


Imagen 1.- Incidencia de melanoma de hombres en el mundo del año 2020. Tomada del Centro internacional de investigaciones sobre el cáncer 2020.

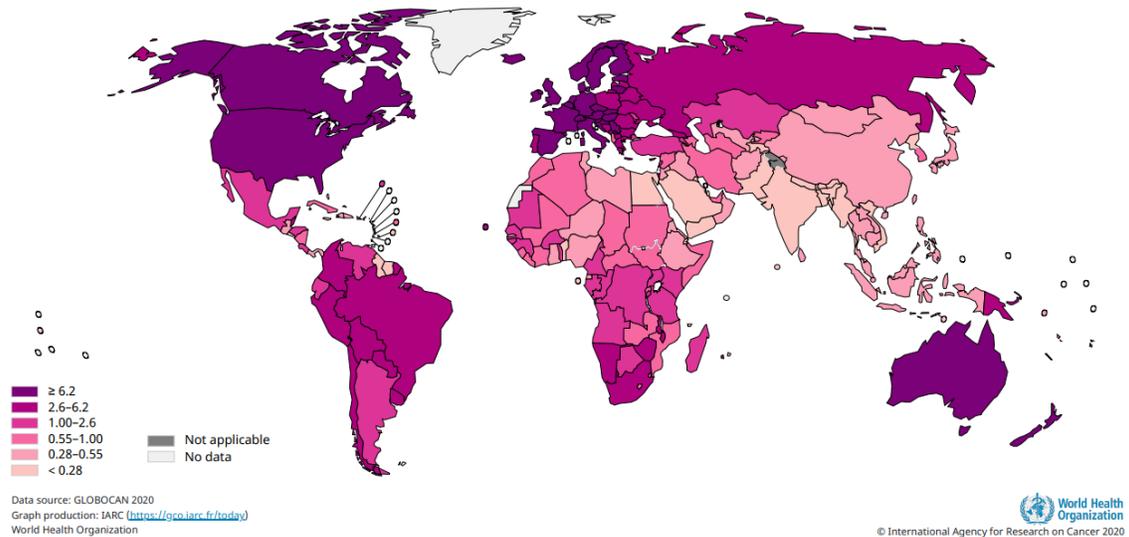


Imagen 2.- Incidencia de melanoma en mujeres en el mundo del año 2020. Tomada del Centro internacional de investigaciones sobre el cáncer 2020.

La edad media de presentación del melanoma es de 58 años en el hombre y de 56 años en la mujer, su distribución es homogénea, a pesar de eso las tasas de incidencia y de mortalidad se incrementan con la edad. La incidencia es más elevada en la mujer antes de los 65 años, y después la tendencia se invierte. La mortalidad es más alta en el hombre. (Gaudy-Marqueste, Monestier, & Grob, 2015)

El fototipo es el fenotipo concomitante con la susceptibilidad de la piel ante el sol. Los distintos fototipos se definen aplicando la clasificación de Fitzpatrick. Los individuos de fototipos más claros, Fitzpatrick tipo I y II (piel clara que no se broncea, cabello rubio o pelirrojo, efélides) están más expuestos al riesgo de melanoma que los individuos de fototipo Fitzpatrick tipo IV y V. (Gaudy-Marqueste, Monestier, & Grob, 2015)

Los factores de riesgo más importantes incluyen: exposición excesiva a luz UV, piel blanca, historia de quemadura solar, lugares con mayor altitud o cerca del ecuador (donde los rayos

solares son más directos), múltiples nevos, nevos atípicos, historia familiar de melanoma, inmunosupresión y la edad. (Castañeda Gameros & Eljure Téllez, 2016)

DIAGNÓSTICO.

Los melanomas cutáneos tienen una apariencia muy variada. Típicamente, las lesiones dérmicas tempranas de melanoma se caracterizan por tener diferentes colores, como distintos tonos de marrón, negro, rojo y azul. El melanoma, así como en la piel también puede aparecer en las uñas con una decoloración o un pigmento café oscuro o negro. Además, puede iniciar en un nevo melanocítico preexistente y cuando esto ocurre, el nevo generalmente demuestra una apariencia “cambiante”, como un incremento de tamaño, o asimetría/irregularidad, o puede sangrar con un traumatismo menor. Un nevo en el que se detecten cambios siempre debe ser estudiado. Los melanomas como ya se mencionó pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, particularmente más no exclusivo, en hombres son más comunes en tronco, mientras que en la mujer son más comunes en miembros inferiores. (Campoli & High, 2019)

El diagnóstico de melanoma se realiza en dos etapas: primero se debe identificar las lesiones suficientemente sospechosas para justificar un control y posteriormente el análisis histológico, que por sí solo permite confirmar el diagnóstico de melanoma. (Gaudy-Marqueste, Monestier, & Grob, 2015)

Los signos para detección temprana se abrevian con el acrónimo ABCDE:

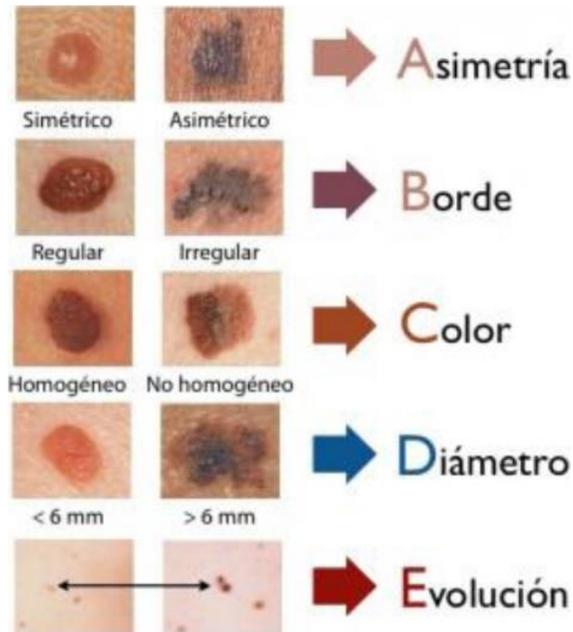


Imagen 3.- ABCDE melanoma (Márquez Díaz, 2020)

SUBTIPO HISTOLÓGICO.

El subtipo histológico se basa en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los tumores cutáneos, la cual lo clasifica en función de los patrones de exposición a la radiación UV, el origen celular, sus características genéticas o su vía de evolución.

(Tejera-Vaquerizo, et al, 2020)

Existen múltiples variantes histológicas del melanoma:

- Lentigo maligno (5-15%)
- De extensión superficial (50-75%)
- Nodular (15-35%)

- Lentiginoso acral (5-10%) forma más común en México. (Herrera González & Aco Flores, 2010)
- Desmoplásico (raro)
- Origen de nevo azul (raro)

(Weedon Patterson, 2016)

El tamaño del tumor hablando específicamente del diámetro, actualmente no representa un factor pronóstico del melanoma como en el caso del carcinoma cutáneo de células escamosas; sin embargo, existen múltiples trabajos que relacionan un mayor diámetro con un peor pronóstico. (Tejera-Vaquerizo, et al, 2020)

SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN DEL MELANOMA AJCC 8ª EDICIÓN

El nivel de Clark se refiere al nivel de invasión en profundidad de la dermis. El nivel I corresponde al melanoma in situ, y el nivel V, a la invasión del tejido subcutáneo. Su valor pronóstico no está tan bien establecido, pero resulta interesante para el melanoma de poco grosor (menos de 1 mm). (Gaudy-Marqueste, Monestier, & Grob, 2015)

Niveles de Clark del cáncer de piel:

- Nivel I.- El cáncer solo se encuentra en la epidermis.
- Nivel II.- El cáncer comenzó a diseminarse a la dermis papilar.
- Nivel III.- El cáncer se diseminó a la unión entre la dermis papilar y reticular.
- Nivel IV.- El cáncer se diseminó a la dermis reticular.
- Nivel V.- El cáncer se diseminó al tejido subcutáneo.

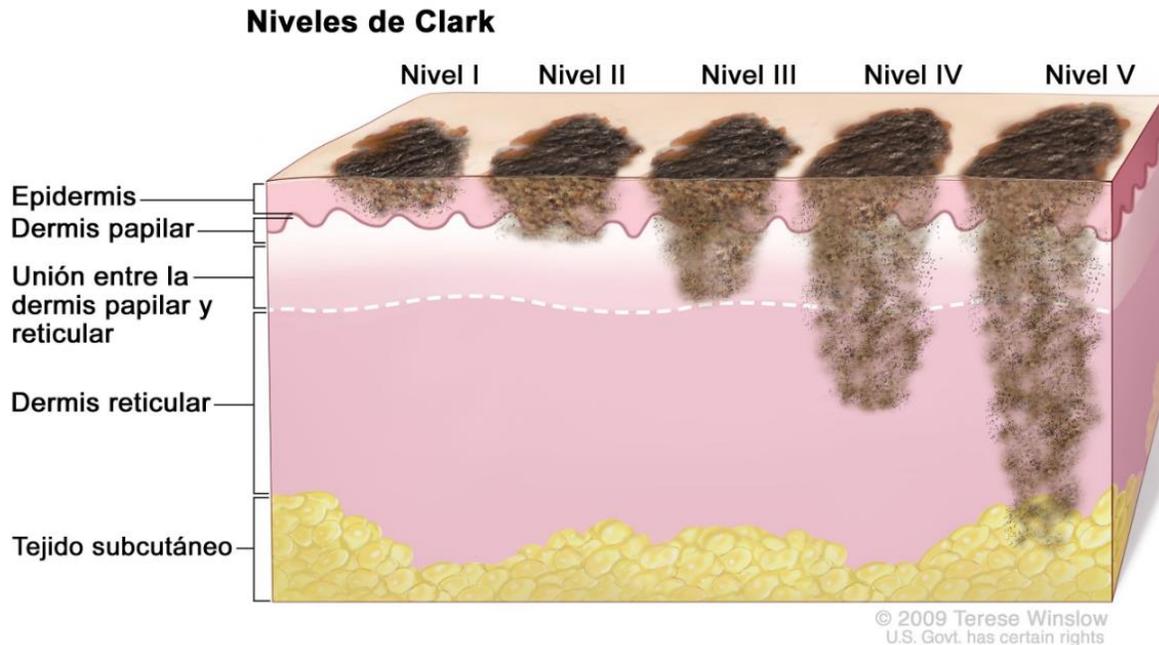


Imagen 4.- Niveles de Clark (Diccionario del Instituto Nacional del Cáncer, s.f.)

El índice de Breslow representa la medida en milímetros al microscopio del grosor máximo comprendido entre la capa granulosa de la epidermis por arriba y la célula melánica maligna más profunda. El melanoma que no presente invasión a la dermis no debe medirse y se denomina «in situ». El índice de Breslow constituye un factor pronóstico independiente predictivo del riesgo de recidiva y de fallecimiento, y existe una correlación casi lineal entre el grosor tumoral y el plazo medio de supervivencia. (Gaudy-Marqueste, Monestier, & Grob, 2015)

El grosor máximo tumoral debe ser medido con un micrómetro ocular bien calibrado. Esta medición se realiza desde la capa granulosa en su límite superior (o del estrato espinoso siempre y cuando la capa granulosa esté ausente) hasta la zona más profunda del tumor. En caso de que el tumor estuviera ulcerado, se comienza la medición desde la base de la úlcera. El grosor tumoral es por sí mismo el factor pronóstico más importante para las clasificaciones

más actuales de la AJCC (**Anexo 1**). La medición se redondea a las décimas de milímetros, lo más cercano a 0,1 mm y no a 0,01 mm, como se recomendaba en anteriores versiones. De esta forma, para melanomas con un grosor entre 0,75-0,84 mm se debe redondear a 0,8 mm e informados como T1b, y, por ejemplo, grosores de entre 1,01 y 1,04 mm deben ser informados como 1,0 mm.

En el caso especial de los melanomas perifoliculares se suele evaluar con tres parámetros:

A) Espesor de Breslow: medido desde la granulosa epidérmica hasta el punto más profundo de melanoma no perifolicular.

B) Espesor folicular de Breslow: medido desde la granulosa epidérmica hasta el punto más profundo de melanoma perifolicular.

C) Grosor folicular: medido desde el punto más interno de la vaina radicular externa, en perpendicular al eje principal del folículo, hasta el punto más alejado de melanoma.

Por último, uno de los problemas adicionales son los melanomas de configuración «verrucosa» o «papilomatosa», en los que el espesor de Breslow varía inmensamente de las papilas a las crestas. En dichos casos se sugiere dar la media de dos valores, es decir, medir el Breslow desde un punto a mitad de distancia desde la base a la punta de una papila. (Tejera-Vaquerizo, et al, 2020)

Los cánceres de piel tipo melanoma pueden estar ulcerados, es decir, la desaparición completa del epitelio y esto empeora el pronóstico en el melanoma, la cual está incluida en la clasificación de la AJCC. Su presencia como ya se mencionó empeora el pronóstico y por tanto aumenta la estadificación del melanoma de «a» a «b» para cualquier grosor (T). La

ulceración verdadera se caracteriza por una reacción tisular a la pérdida de la epidermis con fibrina e inflamación aguda. (Tejera-Vaquerizo, et al, 2020)

EVALUACIÓN DE INFILTRADO LINFOCÍTICO TUMORAL (TIL´s)

El reporte del TIL´s en el melanoma cutáneo primario ha sido durante mucho tiempo rutinaria en la práctica histopatológica, tras el reconocimiento temprano de su importancia pronóstica. La respuesta inmunitaria del huésped al melanoma ha sido destacada por los impresionantes resultados recientes de la terapia con inhibidores del punto de control inmunitario, que ahora es el tratamiento estándar en el melanoma metastásico. (Hendry, et al, 2017)

Los primeros informes establecieron criterios de puntuación simples basados en H&E, clasificando el infiltrado inmunitario como:

- Enérgico (TIL´s presentes en toda la zona de la fase de crecimiento vertical o presentes e infiltrándose en toda la base de la fase de crecimiento vertical)
- No enérgico (TIL´s anotados en uno o más focos de la fase de crecimiento vertical)
- Ausente (totalmente ausente del tumor o presente pero no infiltrando los nidos de células de melanoma). (Hendry, et al, 2017)

En 2012, un grupo del Instituto de Melanoma de Australia propuso una modificación al sistema descrito por Clark y colegas, introduciendo un grado basado en la densidad (ausente/leve/moderada/marcada, puntuación de 0 a 3) y la distribución (ausente/focal/multifocal/difusa, puntuación de 0 a 3) del infiltrado inmune. (Hendry, et al, 2017)

Las posibles combinaciones se colapsaron en 4 grados TIL's de la siguiente manera:

- Grado 0=ausente
- Grado 1 = infiltrado focal leve o moderado, o infiltrado multifocal leve
- Grado 2 = infiltrado difuso leve, focal marcado, multifocal moderado o marcado
- Grado 3 = infiltrado difuso moderado o marcado. (Hendry, y otros, 2017)

Aunque los sistemas de puntuación tradicionales solo han considerado los TIL's intratumorales en el melanoma, tanto los TIL's estromales como los intratumorales pueden evaluarse en el entorno de la investigación. Se excluyen áreas de necrosis o ulceración. (Hendry, et al, 2017)

Aplicación de la metodología estandarizada propuesta para evaluar TIL's en melanoma.

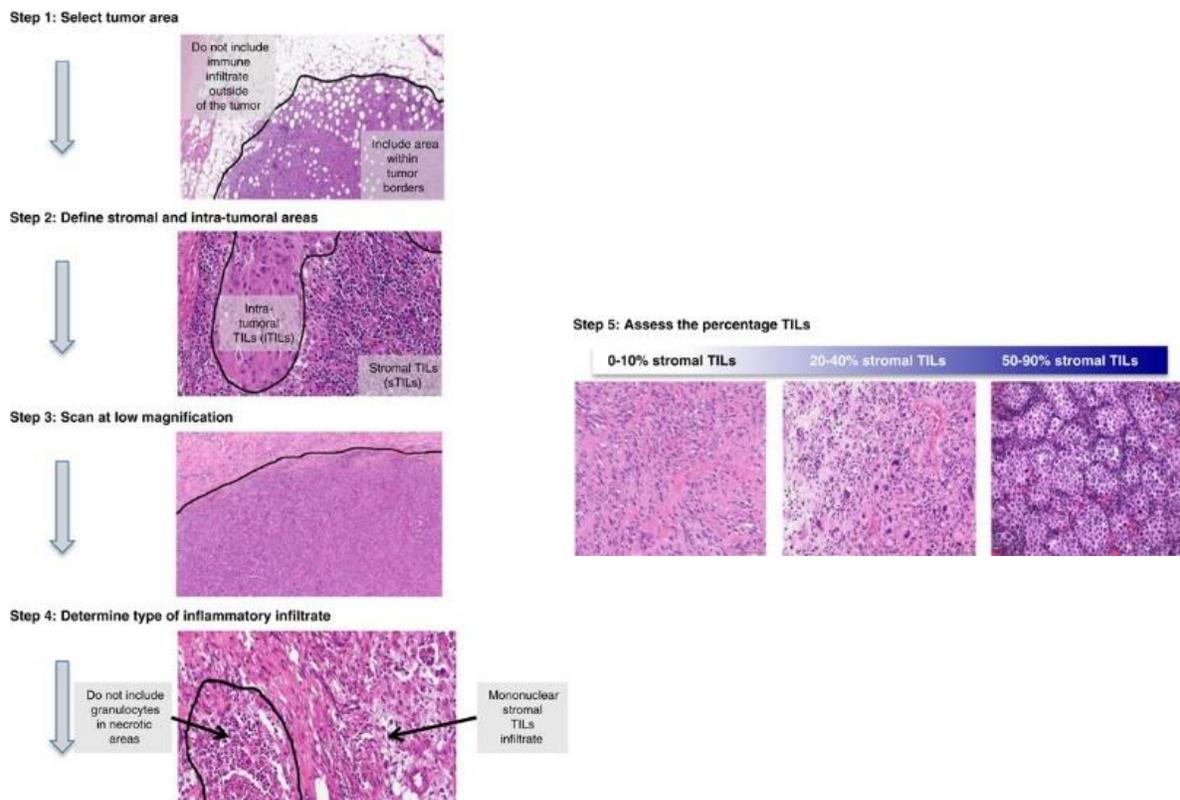


Imagen 5.- Esquema de valoración de TIL's (Hendry, et al, 2017)

Según la AJCC 8va edición, la designación "T" se refiere a un tumor primario que no ha sido tratado previamente. De manera similar, la estadificación clínica se realiza después de la biopsia del melanoma primario (incluida la utilización de información patológica sobre la microestadificación del melanoma primario) con evaluación clínica o de biopsia de los ganglios linfáticos regionales y sitios distantes. La estadificación patológica utiliza la información obtenida de la evaluación patológica, tanto del melanoma primario después de la biopsia o de la escisión amplia, así como de la evaluación patológica de la disección ganglionar regional después de la biopsia del ganglio linfático centinela (necesaria para la categorización de N de todos los melanomas mayores que T1) y/o la linfadenectomía regional completa. Además, para la estadificación patológica, si se conoce la información de cualquier biopsia previa y es relevante para la estadificación, esto debe documentarse en el informe de patología (en la sección de estadificación) y usarse para asignar las categorías T, N y M y los propósitos de estadificación. (Shon, et al, 2021)

PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

Table 44.1 2009 AJCC stage groupings and 5-year survival for primary cutaneous melanoma

STAGE	TUMOR	NODE	METASTASES	5-YEAR SURVIVAL	10-YEAR SURVIVAL
0	Tis	N0	M0	99.5%	99%
IA	T1a	N0	M0	97%	95%
IB	T1b, 2a	N0	M0	92%	86%
IIA	T2b, 3a	N0	M0	81%	67%
IIB	T3b, 4a	N0	M0	70%	57%
IIC	T4b	N0	M0	53%	40%
IIIA	T1-4a	N1a-2a	M0	78%	68%
IIIB	T1-4b	N1a-2c	M0	59%	43%
IIIC	T1-4b	N1b-3	M0	40%	24%
IV	Any T	Any N	M1a-c	15%-20%	15%

Data from Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol.* 2018;25:2105-2110.

*Range reflects the prognostic impact of tumor burden (micrometastasis versus macrometastasis), number of nodes involved, and whether there was extracapsular extension. Patients with in-transit metastases/satellite lesions without metastatic lymph nodes are classified as N2c.

Imagen 6.- TNM y sobrevida global. AJCC 8va edición.

La atención estándar para tratar el melanoma es:

- 1.- Establecer un diagnóstico histológico de la lesión sospechada.
- 2.- Extirpar completamente el tumor con márgenes libres.
- 3.- Evaluar la presencia de enfermedad metastásica.
- 4.- Evaluaciones de seguimiento por el resto de la vida del paciente.

El tratamiento quirúrgico es por mucho el mejor tratamiento para el melanoma en los primeros estadios. En los últimos años, la adición al tratamiento de la inmunoterapia como antiCTLA-4, proteína de muerte celular programada (PD-1) e inhibidores BRAF/MEK ha llevado a una mejor supervivencia en pacientes con melanoma avanzado. (Campoli & High, 2019)

PD-1 (CD279) es una proteína transmembrana tipo I de 288 aminoácidos que se expresa predominantemente en células T de memoria con antígeno en tejidos periféricos y con menos frecuencia en las células B, monocitos activados, dendríticas y células asesinas naturales (NK). PD-1 es homólogo a la familia B7 de receptores de proteínas y es compuesto de inmunoglobulina V como dominio extracelular e intracelular que contiene dos sitios de fosforilación. (Akhtar, Rashid, & Al-Bozom, 2021)

PD-1 juega dos roles opuestos, ya que puede ser beneficioso y perjudicial. En cuanto a sus efectos beneficiosos, juega un papel clave en la reducción de la regulación de respuestas inmunes ineficaces o dañinas y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Sin embargo, la PD-1 provoca la persistencia de las células malignas al interferir con la respuesta inmunitaria protectora (Salmaninejad et al., 2018).

LIGANDO DE MUERTE PROGRAMADA PD-L1

El ligando PD-1 (PD-L1; también conocido como CD279 y B7-H1), pertenece a la serie B7 y es una glicoproteína transmembrana tipo 1 de 33 kDa que contiene 290 aminoácidos con dominios IgE e IgC en su región extracelular. (Han et al., 2020)

El PD-L1 también es necesario para mantener la homeostasis inmune en condiciones fisiológicas normales. Este ligando regula negativamente la actividad de las células T citotóxicas cuando se une a receptores específicos en las células T y protege a las células normales del daño colateral. Por tanto, las células tumorales que expresan PD-L1 pueden dificultar la activación de nuevas células T. (Salmaninejad et al., 2018)

Los estudios han demostrado que los tumores pueden secuestrar el eje PD-1 / PD-L1 como una vía co-inhibitoria para comprometer la respuesta inmune al cáncer mediante el bloqueo de la proliferación, la inducción de la apoptosis por linfocitos T citotóxicos y la promoción de la diferenciación de células T reguladoras, que eventualmente induce un microambiente inmunosupresor en el tumor. (Shen et al., 2019)

MATERIALES Y MÉTODOS

Taxonomía de la investigación

Se realizó un estudio descriptivo, observacional, transversal, retrospectivo con un grado de conocimiento que se desea adquirir de tipo diagnóstico.

Estudio descriptivo: Se usan para la descripción de frecuencia y características importantes de un problema del área de la salud. Este tipo de investigaciones y los datos obtenidos son esenciales para la salud pública y epidemiología. Dicho esto, es el mejor método de recolección de información que demuestra las relaciones y describe la situación tal cual es, como es el caso de la descripción de la expresión del inmunomarcador de PD-L1 y su correlación con el subtipo histológico, estadificación histopatológica de Breslow/Clark y TIL's de casos diagnosticados de melanoma en el Hospital General del Estado de Sonora.

Estudio observacional: Son estudios cuyo objetivo es la observación y análisis de acontecimientos sin que se intervenga el curso natural del suceso, se realizan en un lapso de tiempo (longitudinal), ya sea prospectivo o retrospectivo.

Estudio descriptivo transversal: El estudio tiene como objetivo la estimación de distribución y magnitud de una patología o variable dependiente en un tiempo dado, así como, medir variables entre los individuos de la población.

Estudio retrospectivo: El estudio busca y analiza los eventos que han ocurrido en el pasado. Su planteamiento en base a la dirección en el tiempo es regresivo desde el inicio del estudio.

POBLACIÓN Y PERIODO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en casos diagnosticados con melanoma en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital general del Estado de Sonora realizándose muestreo por conveniencia o también conocido como muestreo no probabilístico en el periodo de 01 de enero de 2016 al 31 de diciembre del 2021.

MUESTREO ESTADÍSTICO

Se realizó un muestreo por conveniencia, es decir un muestreo no probabilístico, no aleatorio, donde se seleccionó el total de casos con diagnóstico histopatológico de melanoma. Se analizó la muestra considerando el total de los casos reportados que cumplieron los criterios de inclusión (ver más adelante).

En virtud de que se realizó un muestreo por conveniencia, no es posible estimar el impacto ni el soporte estadístico de la muestra. Sin embargo, algunos investigadores calculan el tamaño muestral de un muestreo no probabilístico infiriendo la posibilidad de que éste se comporte de manera probabilística y aleatoria. Para el presente protocolo se siguieron las recomendaciones propuestas por la técnica de BIOCARE de la clona CAL10 para la interpretación de la inmunotinción de PD-L1 y se tomó como muestra a la población total de 25 casos comprendida en el periodo estipulado y se realizó el estudio observacional y descriptivo previa selección de los casos que cumplieron con los criterios de inclusión de esta investigación.

Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión

- Casos diagnosticados en el servicio de patología del HGE de Sonora en biopsias inscisionales o escisionales con diagnóstico de melanoma entre el 1 de enero del año 2016 al 31 de diciembre del año 2021.
- Casos diagnosticados de melanoma con laminillas y bloques completos dentro del servicio de Patología.
- Pacientes que cuenten con tejido viable en bloque de parafina.

Criterios de exclusión

- Casos diagnosticados con melanoma, pero que no se cuenta con material completo, laminillas y/o bloques.
- Casos que se diagnosticaron como melanoma por H&E, posteriormente se le realizó estudio de inmunohistoquímica y se modificó el diagnóstico.

Criterios de eliminación

- Ausencia del material en el laboratorio “laminillas y bloques”.
- Bloques de parafina con material en mal estado o insuficiente para estudio de inmunohistoquímica.

Recursos empleados

Recursos físicos

- Computadora tipo laptop
- Assist (recurso electrónico del HGE de Sonora); expedientes electrónicos de los casos seleccionados

- Laminillas y bloques de parafina de los casos seleccionados
- Microsoft Excel
- Microsoft Word
- Inmunomarcador PD-L1 (Ficha técnica de PD-L1 y procedimiento de tinción manual)

Recursos humanos

- Tres médicos adscritos al servicio de anatomía patológica y graduados con la especialidad de anatomía patológica.
- Residente de tercer año de la especialidad de anatomía patológica.
- Químico-biólogo para la realización de la inmunohistoquímica

Recursos financieros

- Públicos del HGE de Sonora
- Propios del tesista

Descripción metodológica

- 1.- Se realizó una búsqueda en los expedientes y carpetas de resultados de patología, se buscaron los casos diagnosticados con melanoma; anotando número de quirúrgico, vaciando los diagnósticos en una computadora en el programa de Microsoft Excel.
- 2.- Se hizo búsqueda de laminillas y bloques de parafina de los casos seleccionados
- 3.- Se seleccionó el área adecuada para la realización del estudio de inmunohistoquímica con su bloque de parafina correspondiente.
- 4.- Se recolectaron datos específicos de las variables, que puedan ser identificadas en la laminilla y encontradas en el reporte de patología.

5.- Los bloques seleccionados y que cumplieron con los criterios establecidos se les realizó la tinción de inmunohistoquímica de PD-L1. (Ficha técnica de PD-L1 y procedimiento de tinción manual)

Las muestras quirúrgicas fueron fijadas con formol al 10% durante 24 a 48 hrs, dependiendo el tamaño de la muestra, se procesaron de forma habitual en casetes.

Para las laminillas de inmunohistoquímica se realizaron cortes histológicos de 4 µm de grosor.

El protocolo de tinción se hizo conforme a la técnica manual de BIOCARE (**Anexo 3**). Se tuvo un control positivo externo correspondiente a tejido de amígdala por contener células inmunitarias (linfocitos y monocitos).

6.- Se revisó en conjunto, tres médicos patólogos adscritos al servicio de patología del HGE de Sonora y médico residente del tercer año de la especialidad de anatomía patológica, reportándose como:

Células tumorales:

- Negativa: Tinción nula
- Positiva: Tinción de membrana citoplasmática positiva en al menos 1%

Una célula neoplásica se cuenta como PD-L1 positiva si hay una tinción membranosa, independientemente de la intensidad de la tinción y si la membrana muestra positividad completa o parcial de PD-L1. Si hay tinción citoplásmica, pero no membranosa, una célula tumoral se considera negativa para PD-L1. Sin embargo, para las células inmunes, la tinción granular citoplásmica o membranosa (incompleta) es suficiente para un recuento positivo.

7.- Se hizo el análisis de resultados.

Ficha técnica PD-L1:

Procedimiento.- Tinción de inmunohistoquímica de PD-L1 Biocare. (**Anexo 3**)

- **Pretratamiento:** Realice la recuperación de calor usando Diva Decloaker.
- **Bloque de peróxido:** Bloquear durante 5 minutos con Peroxidazed 1.
- **Bloqueo de proteínas:** Incubar durante 15 minutos con VAL BLOCK
- **Anticuerpo primario:** Incubar durante 45 minutos a TAC (25-27C°).
- **Polímero:** Incubar durante 30 minutos a TA con un conjugado secundario polímero.
- **Cromógeno:** Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente con DAB de Biocare
- **Contratinción** con hematoxilina.
- **Enjuague** con agua desionizada.

Categorización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida	Tipo de variable
Tamaño tumoral	Tamaño tumoral medido en la pieza.	Tamaño tumoral medido en pieza quirúrgica y registrando en el reporte de patología.	Centímetros	Cuantitativa
Edad	Número de años que ha vivido un individuo desde su nacimiento	Número de años cumplidos hasta el momento de ingreso al estudio	Años	Cuantitativa
Índice de Breslow	Medida de la profundidad hasta la que creció un melanoma en la piel. (Diccionario de cáncer del NCI)	Estadio I: < 1mm Estadio II: > 1 a 2mm Estadio III: > 2mm a 4mm Estadio IV: > 4mm	1.- Estadio I 2.- Estadio II 3.- Estadio III 4.- Estadio IV	Cuantitativa
Escala histopatológica de Clark	Sistema que se usa para describir la profundidad de la diseminación del cáncer en la piel. (Diccionario de cáncer del NCI)	Nivel I.- Cáncer limitado a la epidermis Nivel II.- El cáncer comenzó a diseminarse a la dermis papilar Nivel III.- El cáncer se diseminó a través de la dermis papilar Nivel IV.- El cáncer se diseminó a la dermis reticular. Nivel V.- El cáncer se diseminó al tejido subcutáneo.	1.- Nivel I 2.- Nivel II 3.- Nivel III 4.- Nivel IV 5.- Nivel V	Cualitativa
Infiltrado linfocítico tumoral (TIL)	Linfocitos que se encuentran de forma natural en los infiltrados inflamatorios de algunos tumores sólidos.	Grado 0=ausente Grado 1 o A = infiltrado focal leve o moderado, o infiltrado multifocal leve; Grado 2 o B = infiltrado difuso leve, focal marcado, multifocal moderado o marcado; Grado 3 o C = infiltrado difuso moderado o marcado	Grado 0 Grado 1 Grado 2 Grado 3	Cualitativa ordinal
Tipo histológico	Variables histológicas de melanoma	Lentigo maligno De extensión superficial Nodular Lentiginoso acral Desmoplásico Origen de nevo azul	1.-Lentigo maligno 2.-De extensión superficial 3.-Nodular 4.-Lentiginoso acral 5.-Desmoplásico	Cualitativo

			6.-Origen de nevo azul	
Sexo	Género biológico del paciente	Masculino Femenino	0.- Masculino 1.- Femenino	Cualitativa
PD-L1	Ligando 1 del receptor de muerte celular programada	Negativo sin expresión Positivo con expresión	0.- Negativo 1.- Positivo	Cualitativa ordinal
pT de TNM	Según la AJCC 8va edición. Se requiere una evaluación patológica (microscópica) del tumor primario para una estadificación precisa.	La clasificación T del melanoma se basa en el grosor del tumor primario y la presencia o ausencia de ulceración. (Anexo 2)	1.- T1a 2.- T1b 3.- T2a 4.- T2b 5.- T3a 6.- T3b 7.- T4a 8.- T4b 0.- N/A	Dicotómica

Análisis estadístico

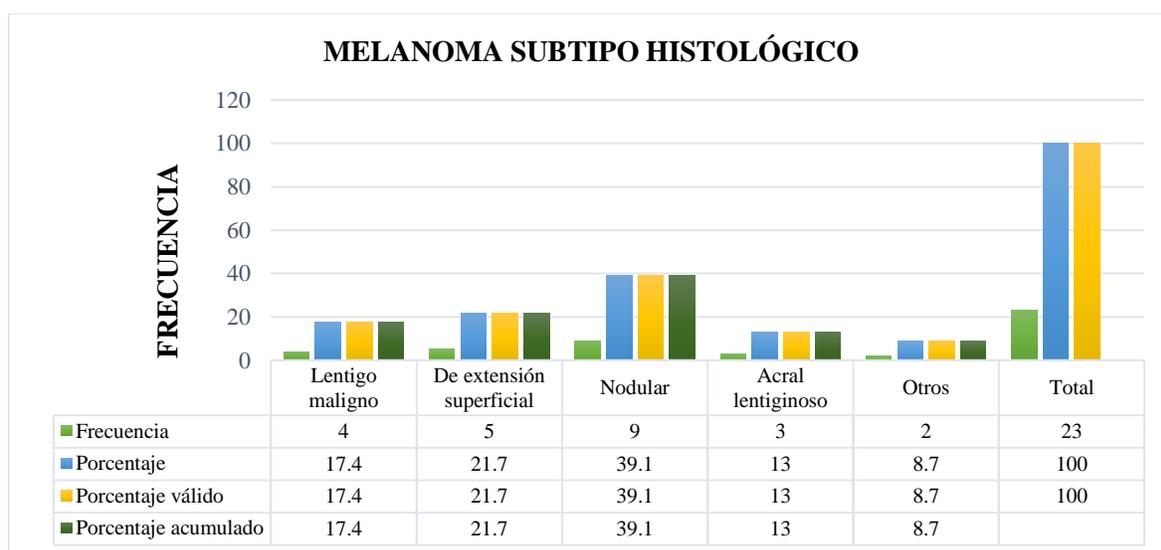
- El plan de análisis se divide en dos fases:
 - Fase descriptiva
 - Fase analítica
- Para cumplir con los objetivos secundarios:
 - Analizar la relación de expresión de PD-L1 con las variables:
 - A.- Subtipos histológicos
 - B.- TIL's
 - C.- Escala histopatológica de Clark
 - D.- Índice histopatológico de Breslow
 - E.- TNM

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud del 2014 en el artículo 17 sección I los estudios retrospectivos no tienen riesgo para el paciente: “Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta...” . De acuerdo con el punto número 23 de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial del 2013, el presente protocolo se enviará a un comité de ética de la investigación para su consideración, comentarios, guía y aprobación. De acuerdo con el punto número 24 de la misma declaración, se resguardará la información personal obtenida de cualquier sujeto involucrado en la investigación. De acuerdo con el punto número 32 de dicha declaración, dejamos en manos del comité de ética de la investigación la decisión respecto al obtener consentimiento informado de los sujetos involucrados en esta investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

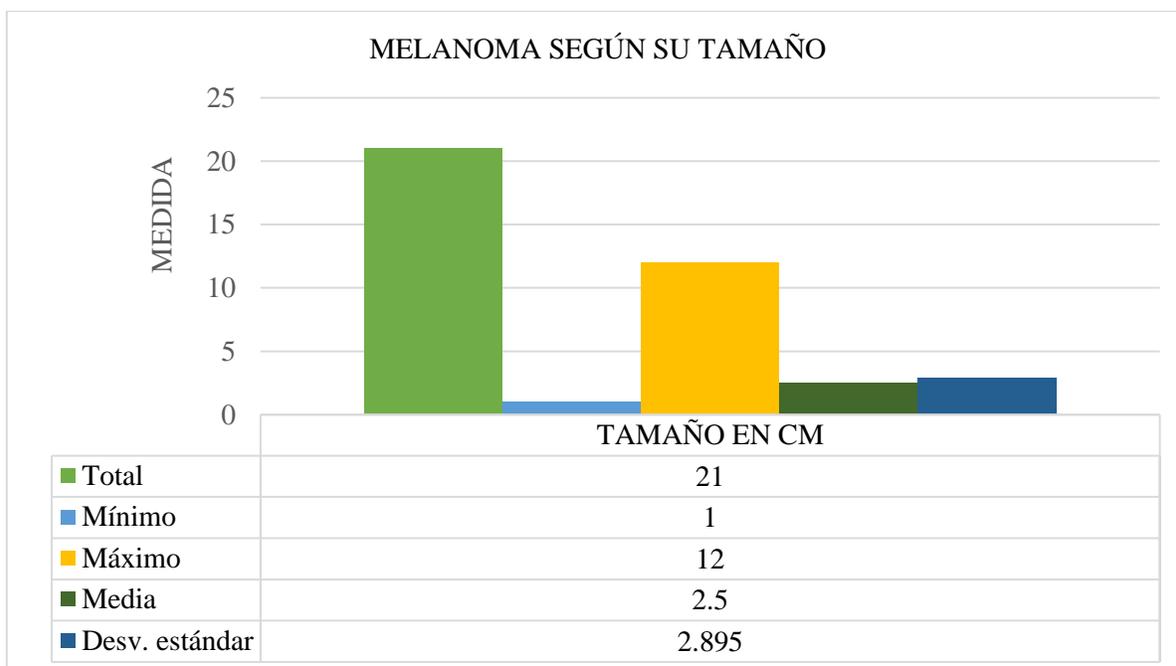
Se realizó una búsqueda en los acervos del servicio de patología de aquellos resultados diagnosticados con melanoma de piel en el periodo de 1 de enero 2016 al 31 de diciembre del 2021, encontrándose 25 registros diagnosticados en biopsias incisionales y escisionales, según los criterios de exclusión ya mencionados, solamente se realizó el estudio en 23 casos, excluyendo 2 casos; uno debido a que el material no era adecuado y otro por errores en el diagnóstico. Se clasificaron según el subtipo histológico en: lentigo maligno (4 casos), de extensión superficial (5 casos), nodular (9 casos), lentiginoso acral (3 casos) y otros (un melanoma maligno de tipo epiteloma y un melanoma uveal). Herrera y colaboradores muestran que el subtipo lentiginoso acral es la forma más común en México, se especifica que su incidencia es más alta en población de piel oscura fenotipos Fitzpatrick III y IV, mientras que el de extensión superficial es el tipo más común en países caucásicos. A pesar de eso en nuestra serie el subtipo más común fue el nodular con 9 casos contra 3 casos de lentiginoso acral, eso tal vez propiciado por la zona geográfica desértica de Sonora.



Gráfica 1.- Casos de melanoma según subtipo histológico.

TAMAÑO

El tamaño promedio de casos diagnosticados de melanoma o nevo sospechoso de un melanoma es de 0.6 cm. En este estudio el tamaño mínimo de la muestra fue de 1 cm y el máximo de 12 cm, con una media de 2.5 cm, lo cual concuerda con la estadística de la OMS.

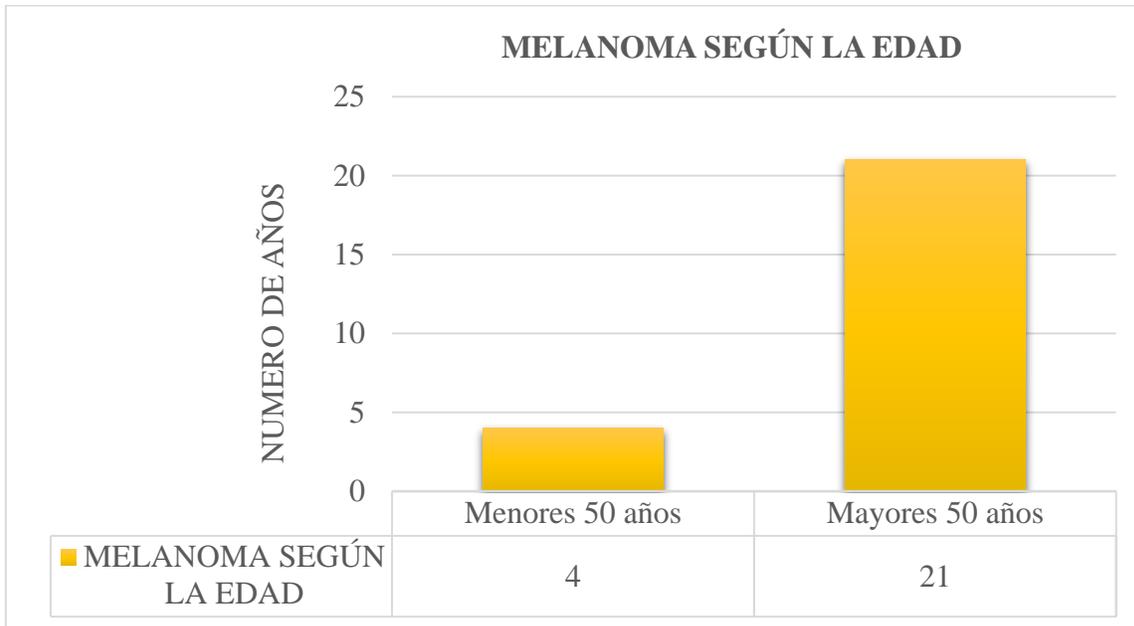


Gráfica 2.- Casos de melanoma según el tamaño.

EDAD

Los datos muestran una edad mínima de presentación de los casos de melanoma de 20 años y una máxima de 80 años con una media de 63.26 años concordando con la edad de presentación a nivel mundial que es entre la sexta y la séptima década de la vida según la OMS. La desviación estándar fue de 16.321, Yang y cols. en una serie de casos donde se comparó la concordancia de inmunotinción PD-L1 y mutaciones somáticas (BRAF, NRAS

Y TERT), tuvieron un rango de edad de 54 a 78 años con una media de 69 años. Dicho estudio comparte la estadística según edad en una serie más grande.



Gráfica 3.- Cáncer de piel tipo melanoma y edad de presentación.

MELANOMA DE PIEL Y PD-L1

Se realizó el diagnóstico de los 25 casos de melanoma, se excluyeron dos y posteriormente se clasificaron según el subtipo histológico (**imagen 7**), el subtipo histológico más común en este estudio fue melanoma nodular con 9 casos. Gaudy-Marqueste y colaboradores presentan el melanoma de extensión superficial como el más común en un 70% de los casos y en segundo lugar el nodular con un 10 a 20% de los casos, en esta serie probablemente se invirtió esta estadística por lo limitado del tamaño de la muestra. Posteriormente se realizó la inmunotinción con PD-L1, tomando en cuenta la positividad tanto de células tumorales e inflamatorias (**imagen 8**).

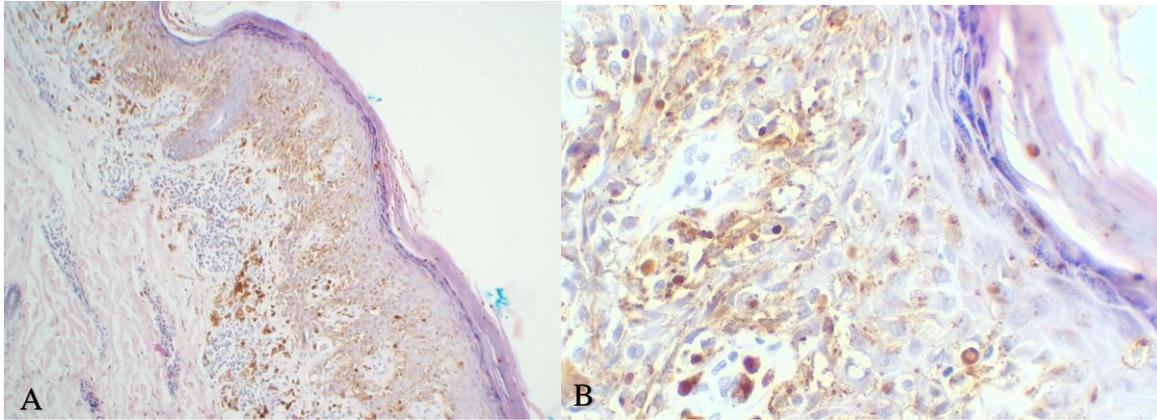


Imagen 7.- Carcinoma de piel de tipo melanoma. A. Melanoma subtipo de extensión superficial aumento 10x. B. aumento 40x. (H&E) Imagen tomada por el Dr. Alfredo López Turnbull.

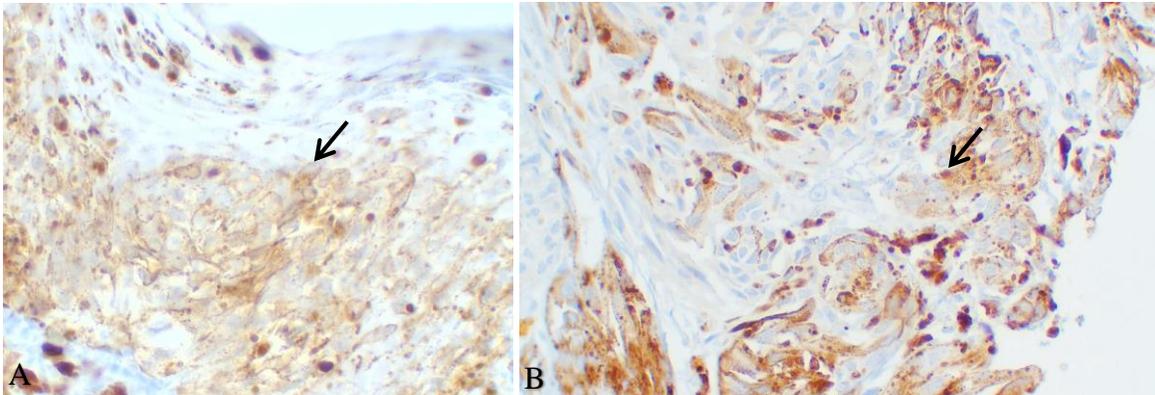
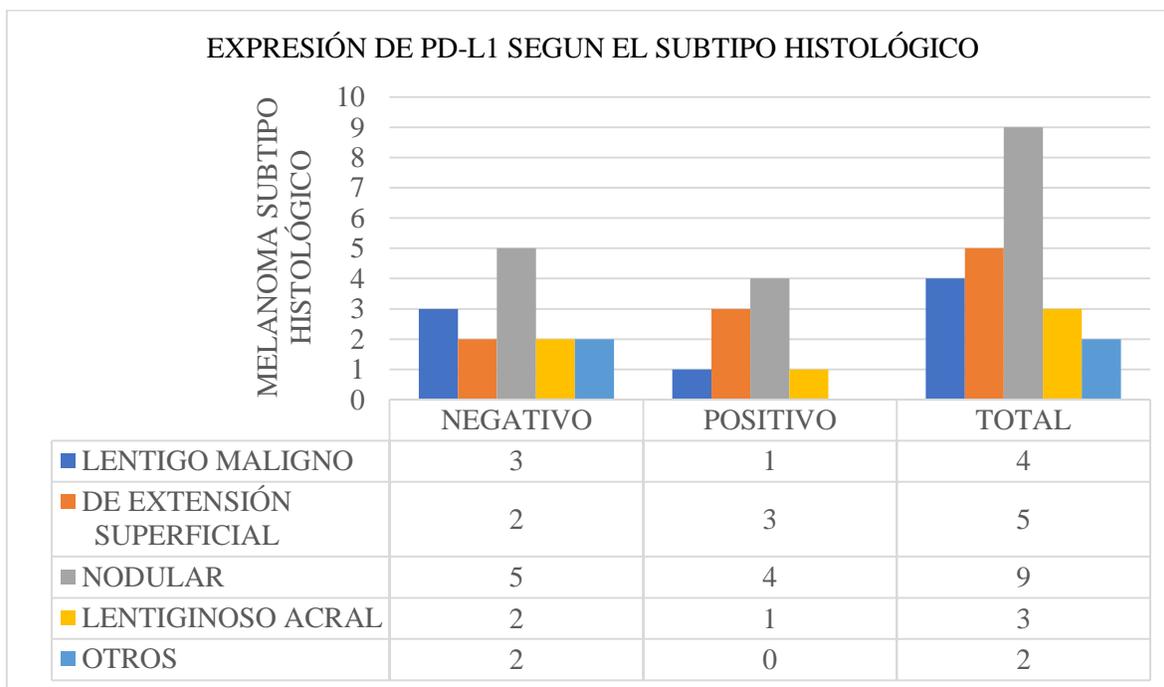


Imagen 8.- A: Tinción de inmunohistoquímica PD-L1 a nivel de membrana en células tumorales de melanoma. (flecha). B: Tinción de inmunohistoquímica PD-L1 a nivel de membrana en células inflamatorias. (flecha). Aumento 40x.

MELANOMA SUBTIPO HISTOLÓGICO Y PD-L1

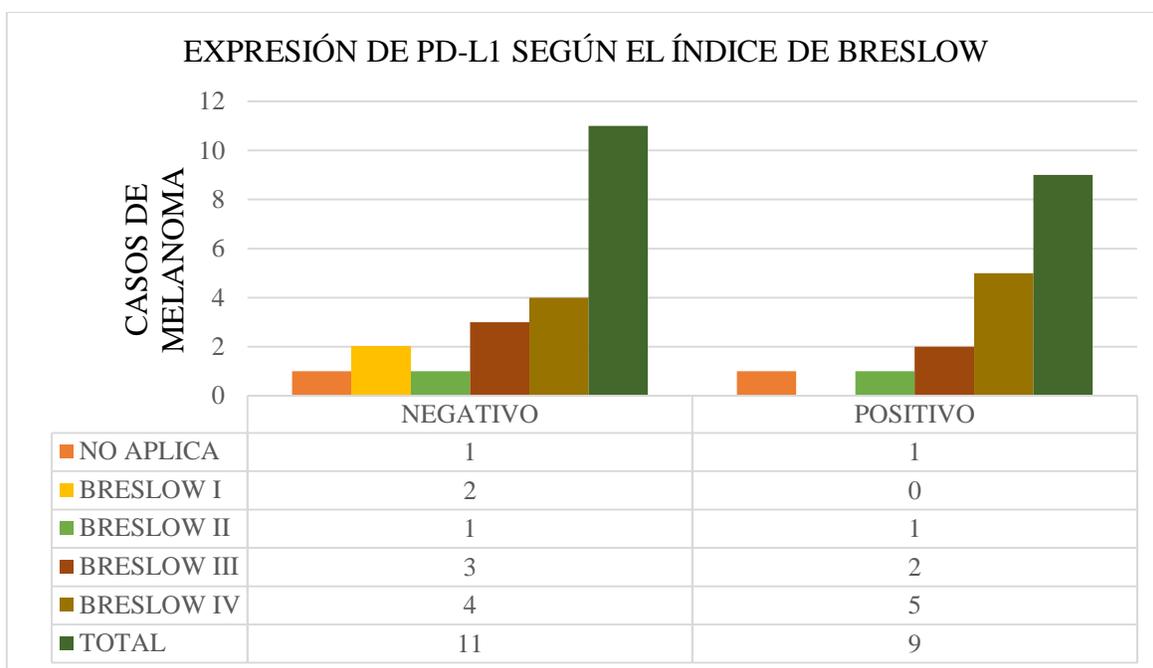
Los resultados obtenidos según la relación entre la expresión de PD-L1 y los subtipos histológicos son: lentigo maligno (3 casos negativos y 1 positivo), de extensión superficial (2 casos negativos y 3 positivos), nodular (5 casos negativos y 4 positivos), lentiginoso acral (2 casos negativos y 1 positivo) y negatividad en las otras dos variantes. Xu, J. y colaboradores muestran resultados similares donde se analizó la expresión de PD-L1 y los subtipos histológicos: extensión superficial, nodular y lentiginoso acral, donde no se observaron diferencias significativas entre estos. Por este motivo se infiere que la expresión ya sea negativa o positiva del inmunomarcador PD-L1 no tiene relación directa con el subtipo histológico del melanoma, a pesar de los resultados, la muestra de este estudio es limitada en número, se sugiere realizar un estudio con mayor tamaño de la muestra para concluir que efectivamente no tienen ninguna significancia. **Gráfica 4**



Gráfica 4.- Distribución de casos de melanoma según la expresión de PD-L1 según el subtipo histológico.

ÍNDICE DE BRESLOW Y PD-L1

Los resultados obtenidos comparando la expresión del inmunomarcador PD-L1 y los estadios del índice de Breslow son: Breslow I (2 casos negativos y 0 positivos), Breslow II (1 caso negativo y 1 positivo), Breslow III (3 casos negativos y 2 positivos), Breslow IV (4 casos negativos y 5 positivos), dando un total de la muestra negativa del inmunomarcador de 11 casos y una expresión positiva de 9 casos. Hino y colaboradores encontraron que la expresión de PD-L1 es directamente proporcional al grado de invasión. En el presente estudio no se encontro significancia estadística con un valor de Chi-cuadrada de Pearson de 2.132^a, probablemente se deba al tamaño limitado de la muestra. **Gráfica 5 y Tabla 1**



Gráfica 5.- Expresión de PD-L1 según el índice de Breslow.

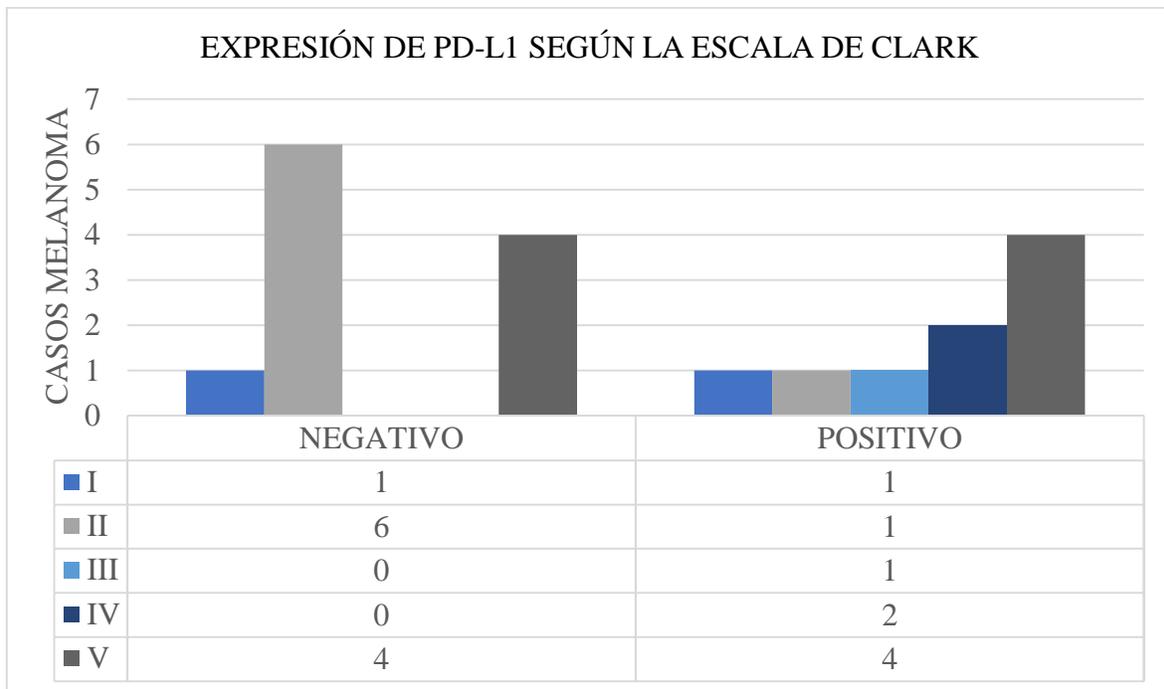
Tabla 1.- Pruebas de chi-cuadrado de Expresión de PD-L1 según índice de Breslow.

Pruebas de chi-cuadrado de índice de Breslow			
	Valor	GL	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.132 ^a	4	.711
Razón de verosimilitud	2.885	4	.577
Asociación lineal por lineal	.580	1	.446
N de casos válidos	20		

a. 10 casillas (100.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es .90. GL. Grados de libertad

ESCALA HISTOPATOLÓGICA DE CLARK Y PD-L1

Los resultados obtenidos comparando la expresión de PDL-1 y la escala histopatológica de Clark; estadio Clark I (1 caso negativo y 1 positivo), Clark II (6 casos negativos y 1 positivo), Clark III (0 casos negativos y 1 positivo), Clark IV (0 casos negativos y 2 positivos) y Clark V (4 casos negativos y 4 positivos), el total de los resultados dan una negatividad del inmunomarcador de 11 casos y una expresión positiva de 9 casos. No demuestra una relación entre los grados de invasión de las capas de la piel y la expresión de PDL-1, comparativamente no se encontró significancia estadística con valor de Chi-cuadrada de Pearson 6.436^a. **Gráfica 6 y Tabla 2.**



Grafica 6.- Expresión de PD-L1 según escala de Clark.

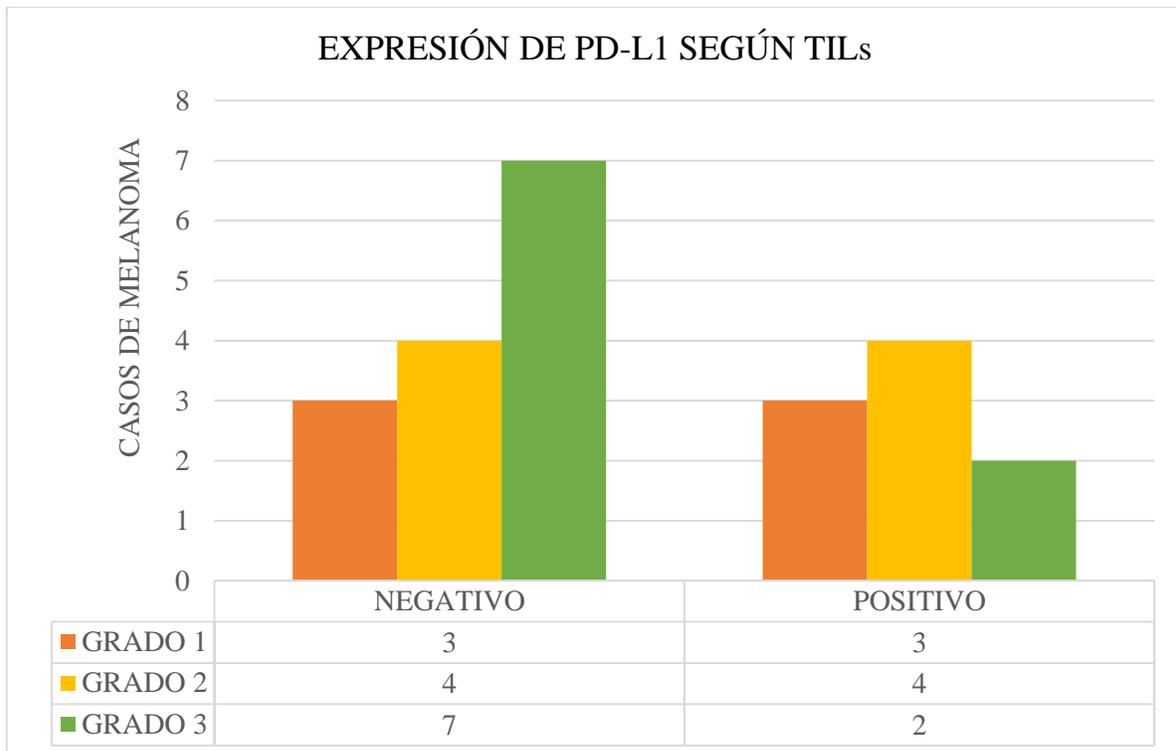
Tabla 2.- Pruebas de chi-cuadrado de la escala de Clark.

Pruebas de chi-cuadrado escala de Clark			
	Valor	GL	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6.436 ^a	4	.169
Razón de verosimilitud	7.921	4	.095
Asociación lineal por lineal	1.222	1	.269
N de casos válidos	20		

a. 10 casillas (100.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es .45. GL. Grados de libertad.

TIL's Y PD-L1

Los resultados de la serie comparando el PD-L1 y el grado de TIL's son: grado 1 o A (3 negativos y 3 positivos), grado 2 o B (4 negativos y 4 positivos) y grado 3 o C (7 negativos y 2 positivos) dando un total de 14 casos negativos y positividad de 9 casos. Xu y colaboradores encontraron que la expresión de PD-L1 es más alta a mayor grado de TIL's. En el presente estudio comparativamente con el grado de TIL's no se encontró significancia estadística con valor de Chi-cuadrada de Pearson 1.775^a, esto sugiere que se necesita ampliar el tamaño de la muestra para futuros estudios. **Gráfica 7 y Tabla 3**



Gráfica 7.- Expresión de PD-L1 según TIL's.

Tabla 3.- Pruebas de chi-cuadrada de expresión de PD-L1 según TIL´s.

Pruebas de chi-cuadrado TIL´s			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.775 ^a	2	.412
Razón de verosimilitud	1.846	2	.397
Asociación lineal por lineal	1.299	1	.254
N de casos válidos	23		

a. 5 casillas (83.3%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2.35.

Los datos obtenidos indican que no existe una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del inmunomarcador PD-L1 y las diferentes variables histopatológicas, al contrario de estudios anteriores como el de Xu y cols. donde se asocia la positividad de PD-L1 con características clinicopatológicas de mal pronóstico de melanoma, refiriendo específicamente en TIL´s una asociación significativa entre un TIL´s alto (grado C o 3) y una positividad aumentada de PD-L1. Debido al tamaño pequeño de la muestra de este estudio que pudo haber influenciado directamente en los resultados obtenidos, se sugiere en estudios posteriores un tamaño de muestra mayor al realizado. Así mismo, se sugiere realizar estudios para determinar la probable respuesta a tratamiento con anti-PD-L1 en los casos reportados como positivos.

CONCLUSIONES

En conclusión, la inmunomarcación de PD-L1 de células tumorales o infiltrado linfocítico tumoral en melanoma de piel no demostró ninguna relación con sus características histopatológicas; subtipo histológico, infiltrado linfocítico tumoral, índice de Breslow y escala histopatológica de Clark. Los factores que pudieron haber intervenido en esto, es el tamaño de la muestra estudiada.

LITERATURA CITADA

1. Akhtar, M., Rashid, S., & Al-Bozom, I. A. (2021). PD–L1 immunostaining: what pathologists need to know. *Diagnostic Pathology*, 1-11.
2. Campoli, M. R., & High, W. A. (2019). MELANOMA. *American Cancer Society*, 405.
3. Castañeda Gameros, P., & Eljure Téllez, J. (2016). El cáncer de piel, un problema actual. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*.
4. *Diccionario del Instituto Nacional del Cáncer*. (s.f.). Obtenido de Instituto Nacional del Cáncer:
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/nivel-de-clark-iii-de-cancer-de-piel>
5. Dickson, P. V., & J. E. (2011). Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 1-17.
6. Frydenlund, N., & Mahalingam, M. (2017). PD-L1 and immune escape: insights from melanoma and other lineage-unrelated malignancies. *Human Pathology*, 13-33.
7. Gaudy-Marqueste, C., Monestier, S., & Grob, J.-J. (2015). Melanoma. *EMC - Dermatología*, 1-20.
8. Hendry, S., Salgado, R., Gevaert, T., Prudence, A. R., John, T., Bibhusal, T., . . . Van den Eynden, G. (2017). Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized

- Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinom. *Advances in Anatomic Pathology*, 311-315.
9. Hernandez-Domínguez, D. A., Aldaco-Sarvide, F., Cervantes-Sánchez, G., Erazo-Valle-Solís, A. A., Pérez-Pérez, P., Torrecillas-Torres, L., . . . Diaz Alvarado, G. (2018). La mortalidad por melanoma en México aumenta. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. .
 10. Herrera Gonzalez, N. E., & Aco Flores, A. Y. (2010). El melanoma en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 161-164.
 11. Herrera González, N. E., & Aco Flores, A. Y. (2010). El melanoma en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, págs. 161-164.
 12. Márquez Díaz, J. E. (2020). Visión artificial profunda aplicada a la identificación temprana de cáncer no melanoma y queratosis actínica. *Computación y Sistemas*, 751–766.
 13. Observatory, G. C. (March de 2020). *World Health Organization* . Obtenido de Global Cancer Observatory:
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
 14. Shon, W., Frishberg, D. P., Gershenwald, J., Gill, P., North, J., Prieto, V. G., . . . Smoller, B. R. (0 de November de 2021). *College of American Pathologists*. Obtenido de College of American Pathologists: <https://www.cap.org/>
 15. Tejera-Vaquerizo, A., Fernandez-Figueras, M., Santos-Briz, A., Ríos-Martín, J., Monteagudo, C., Fernández-Flores, A., . . . Rodríguez-Peralto, J. (2020). Protocolo

de diagnóstico histológico para muestras de pacientes con melanoma cutáneo.
ACTAS Dermo-Sifiliográficas, 32-43.

16. Torres-Cabala, C., Li-Ning-Tapia, E., & Hwu, W.-J. (2020). Pathology-based Biomarkers Useful for Clinical Decisions in Melanoma. *Archives of Medical Research*, 827-838.
17. Weedon Patterson, J. (2016). *Weedon's Patologia de piel*. Elsevier Limited.
18. Xu, J., Wang, F., Yan, Y., Zhang, Y., Du, Y., & Sun, G. (2020). Prognostic and Clinicopathological Value of PD-L1 in Melanoma: A Meta-Analysis. *THE AMERICAN JOURNAL OF THE MEDICAL SCIENCES*, 340-346.
19. Yang, S., Leone, D., Biswas, A., Deng, A., Jukic, D., Singh, R., . . . Mahalingam, M. (2018). Concordance of somatic mutation profiles (BRAF, NRAS, and TERT) and tumoral PD-L1 in matched primary cutaneous and metastatic melanoma samples. *Human Pathology*, 206-214.

ANEXOS

ANEXO 1.-

Clasificación del TNM de la Union for International Cancer Control y del American Joint Committee on Cancer, octava revisión.

Estadios	Criterios
IA	Breslow \leq 1 mm sin ulceración y mitosis $<$ 1/mm ² (pT1a), No, Mo
IB	Breslow \leq 1 mm, con ulceración o mitosis \geq 1/mm ² (pT1b), No, Mo 1 mm $<$ Breslow \leq 2 mm sin ulceración (pT2a), No, Mo
IIA	1 mm $<$ Breslow \leq 2 mm con ulceración (pT2b), No, Mo 2 mm $<$ Breslow \leq 4 mm sin ulceración (pT3a), No, Mo
IIB	2 mm $<$ Breslow \leq 4 mm con ulceración (pT3b), No, Mo Breslow $>$ 4 mm sin ulceración (pT4a), No, Mo
IIC	Breslow $>$ 4 mm con ulceración (pT4b), No, Mo
IIIA	Tumor sin ulceración (todos pT), metástasis microscópicas en 1, 2 o 3 ganglios linfáticos regionales (N1a, 2a), Mo
IIIB	Tumor sin ulceración (todos pT), metástasis macroscópicas en 1, 2 o 3 ganglios linfáticos regionales o metástasis «en tránsito» (N1b, 2b, 2c), Mo Tumor con ulceración (todos pT), metástasis microscópicas en 1, 2 o 3 ganglios (N1a, 2a), Mo
IIIC	Tumor con ulceración (todos pT), metástasis macroscópicas en 1, 2 o 3 ganglios linfáticos regionales o metástasis «en tránsito» (N1b, 2b, 2c), Mo Tumor con o sin ulceración (todos pT), metástasis en 4 ganglios o ganglios linfáticos regionales o más o metástasis «en tránsito» con metástasis ganglionar(es) regional(es) (N3)
IV	Metástasis a distancia (todos pT, todos N, M1)

pT: tumor patológico; N: ganglio; M: metástasis.

ANEXO 2.-

CLASIFICACIÓN DE ETAPAS PATOLÓGICAS (pTNM, AJCC 8.^a edición)

Descriptores TNM (seleccione todos los que correspondan)

- No aplica: _____
- m (múltiples)
- r (recurrencia o retratamiento)
- y (posterapia o posterapia neoadyuvante)

Categoría pT

- pT no asignado (no se puede determinar en base a la información patológica disponible)
- pT0: Sin evidencia de tumor primario (p. ej., melanoma primario desconocido o en regresión completa)
- pT1: Melanoma de 1,0 mm o menos de espesor, estado de ulceración desconocido o no especificado
 - pT1a: melanoma de menos de 0,8 mm de grosor, sin ulceración
 - pT1b: Melanoma de menos de 0,8 mm de espesor con ulceración; o Melanoma de 0,8 a 1,0 mm de espesor con o sin ulceración
 - pT1 (no se puede determinar la subcategoría)
- pT2: Melanoma de más de 1,0 a 2,0 mm de espesor, estado de ulceración desconocido o no especificado
 - pT2a: melanoma de más de 1,0 a 2,0 mm de grosor, sin ulceración
 - pT2b: Melanoma de más de 1,0 a 2,0 mm de espesor, con ulceración
 - pT2 (no se puede determinar la subcategoría)
- pT3: Melanoma de más de 2,0 a 4,0 mm de espesor, estado de ulceración desconocido o no especificado
 - pT3a: melanoma de más de 2,0 a 4,0 mm de espesor, sin ulceración
 - pT3b: Melanoma de más de 2,0 a 4,0 mm de espesor, con ulceración
 - pT3 (no se puede determinar la subcategoría)
- pT4: Melanoma de más de 4,0 mm de espesor, estado de ulceración desconocido o no especificado
 - pT4a: Melanoma de más de 4,0 mm de espesor, sin ulceración
 - pT4b: Melanoma de más de 4,0 mm de espesor, con ulceración
 - pT4 (no se puede determinar la subcategoría)

Categoría pN

Las subcategorías pN1b, 2b y 3b dependen de la información clínica que puede no estar disponible para el patólogo.

Si la información no está disponible, se debe seleccionar la categoría principal (pN1, pN2 o pN3).

- pN no asignado (no se han enviado ni encontrado nodos)
- pN no asignado (no se puede determinar en base a la información patológica disponible)
- pN0: No se detecta metástasis en ganglios linfáticos regionales
- pN1: un ganglio afectado por el tumor o metástasis en tránsito, satélite y/o microsátélite sin ganglios afectados por el tumor

___ pN1a: un ganglio clínicamente oculto relacionado con el tumor (es decir, detectado por biopsia del ganglio centinela) sin metástasis en tránsito, satélite y/o microsatélite

___ pN1b: un ganglio afectado por el tumor detectado clínicamente sin ganglios en tránsito, satélite y/o metástasis de microsatélites

___ pN1c: Presencia de metástasis en tránsito, satélite y/o microsatélite, sin enfermedad regional de ganglios linfáticos.

___ pN1 (no se puede determinar la subcategoría)

pN2: Metástasis en dos a tres ganglios regionales o en tránsito, satélite y/o microsatélite con uno ganglio afectado por el tumor

___ pN2a: dos o tres ganglios clínicamente ocultos relacionados con el tumor (es decir, detectados por biopsia del ganglio centinela) sin metástasis en tránsito, satélite y/o microsatélite

___ pN2b: de dos a tres ganglios afectados por el tumor, al menos uno de los cuales se detectó clínicamente sin metástasis en tránsito, satélite y/o microsatélite

___ pN2c: un ganglio clínicamente oculto o detectado con compromiso tumoral con presencia de nódulo en tránsito, satélite y/o microsatélite

___ pN2 (no se puede determinar la subcategoría)

pN3: metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos regionales, o metástasis en tránsito, satélite o microsatélite con dos o más ganglios afectados por el tumor o cualquier número de ganglios enmarañados con o sin metástasis en tránsito, satélite o microsatélite

___ pN3a: cuatro o más ganglios clínicamente ocultos relacionados con el tumor (es decir, detectados por el ganglio centinela).

___ pN3b: cuatro o más ganglios afectados por el tumor, al menos uno de los cuales se detectó clínicamente, sin metástasis en tránsito, satélite y/o microsatélite

___ pN3c: dos o más ganglios linfáticos clínicamente ocultos o detectados con tumores en tránsito, metástasis de satélites y/o microsatélites y/o cualquier número de nódulos enmarañados con en tránsito, metástasis satelitales y/o microsatélites

___ pN3 (no se puede determinar la subcategoría)

Categoría pM (requerido solo si se confirma patológicamente)

Los sufijos de categoría AJCC pM "(0)" y "(1)", que denotan el nivel de elevación de LDH, NO están incluidos en el informe de patología quirúrgica.

Los niveles de LDH, al igual que con otros parámetros clínicos, pueden ser incluidos en la clasificación final por médicos con acceso a estos datos

___ No aplicable: pM no se puede determinar a partir de la(s) muestra(s) enviada(s)

pM1: metástasis a distancia (documentada en este espécimen)

___ pM1a: Metástasis a distancia en piel, tejidos subcutáneos, tejidos blandos incluyendo músculo y/o ganglios linfáticos no regionales

___ pM1b: metástasis a distancia en el pulmón con o sin sitios de enfermedad M1a

___ pM1c: Metástasis a distancia en sitios viscerales fuera del SNC con o sin sitios de enfermedad M1a o M1b

___ pM1d: metástasis a distancia en el SNC con o sin sitios de enfermedad M1a, M1b o M1c

___ pM1 (no se puede determinar la subcategoría)

ANEXO 3.-

PD-L1

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3171-102620

BIOCARE
MEDICAL

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3171 A, C	0.1, 1.0 mL	1:100	Rinsor Red
Predilute	API 3171 AA	6.0 mL	Ready-to-use	N/A
OMCORE Pro	OPAI 3171 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
VALENT	VLTR 3171 G20	20 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine – For Benchmark	AVI 3171 G	6.0 mL	Ready-to-use	N/A

Intended Use:

For In Vitro Diagnostic Use

PD-L1 [CAL10] is a rabbit monoclonal antibody that is intended for laboratory use in the qualitative identification of PD-L1 protein by immunohistochemistry (IHC) in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) human tissues. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and Explanation:

Programmed death ligand 1 (PD-L1, also known as CD274) inhibits tumor-reactive T cells via binding to the programmed death-1 (PD-1) receptor, rendering tumor cells resistant to CD8+ T cell-mediated lysis (1). Studies have shown that the inhibitory receptor PD-1 is expressed on tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) while PD-L1 is expressed on tumor cells. Assessment of PD-L1 expression in combination with CD8+TIL density may be a useful predictive metric in multiple cancers, including stage III NSCLC, hormone receptor negative breast cancer and sentinel lymph node melanoma (2-4). Clinical trials utilizing humanized chimeric antibodies that block inhibitory checkpoints, such as anti-PD-1 and anti-PD-L1, have demonstrated delayed tumor growth and increased survival (5). While identification of PD-L1 overexpression by IHC is not yet standardized, it has become increasingly important to identify these tumors, as a directed therapy may improve clinical outcomes in these patients (6). In cutaneous melanoma, the targeting of PD-1/PD-L1 has provided meaningful clinical benefit for patients in just the past 5-10 years (7). The use of IHC for protein identification, along with novel therapies, such as checkpoint inhibitors and vaccines, are generating new options for the treatment of cancer patients. The PD-L1 [CAL10] clone does not cross react with PD-L2.

Principle of Procedure:

Antigen detection in tissues and cells is a multi-step immunohistochemical process. The initial step binds the primary antibody to its specific epitope. After labeling the antigen with a primary antibody, a one-step or two-step detection procedure can be applied. A one-step procedure will feature an enzyme labeled polymer that binds the primary antibody. A two-step procedure will feature a linker antibody added to bind to the primary antibody. An enzyme-labeled polymer is then added to bind the linker antibody. These detections of the bound antibodies are evidenced by a colorimetric reaction.

Source:

Rabbit monoclonal

Species Reactivity:

Human; others not tested

Clone:

CAL10

Isotype:

IgG

Protein Concentration:

Call for lot specific Ig concentration.

Epitope/Antigen:

Peptide corresponding to the region within human PD-L1

Cellular Localization:

Membranous/cytoplasmic

Positive Tissue Control:

Lung adenocarcinoma or tonsil

Known Applications:

Immunohistochemistry (formalin-fixed paraffin-embedded tissues)

Supplied As: Buffer with protein carrier and preservative

Storage and Stability:

Store at 2°C to 8°C. The product is stable to the expiration date printed on the label, when stored under these conditions. Do not use after expiration date. Diluted reagents should be used promptly; any remaining reagent should be stored at 2°C to 8°C.

Protocol Recommendations (VALENT® Automated Slide Staining Platform):

VLTR3171 is intended for use with the VALENT. Refer to the User Manual for specific instructions for use. Protocol parameters in the Protocol Manager should be programmed as follows:

Deparaffinization: Deparaffinize for 8 minutes with Val DePar.

Pretreatment: Perform heat retrieval at 98°C for 60 minutes using Val AR-Hi pH, 5X (use at 1X).

Peroxidase Block: Block for 5 minutes with Val Peroxidase Block.

Protein Block: Incubate for 10 minutes with Val Background Block.

Primary Antibody: Incubate for 45 minutes.

Secondary: N/A

Linker: Incubate for 10 minutes with Val Universal Linker.

Polymer: Incubate for 20 minutes with Val Universal Polymer.

Chromogen: Incubate for 5 minutes with Val DAB.

Counterstain: Counterstain for 5 minutes with Val Hematoxylin.

Protocol Recommendations (intellIPATH FLX® and manual use):

Peroxide Block: Block for 5 minutes with Peroxidized 1.

Pretreatment: Perform heat retrieval using Diva Decloaker. Refer to the Diva Decloaker data sheet for specific instructions.

Protein Block (Optional): Incubate for 5-10 minutes at RT with Background Punisher.

Primary Antibody: Incubate for 30 minutes at RT.

Probe: N/A

Polymer: Incubate for 30 minutes at RT with a secondary-conjugated polymer.

Chromogen: Incubate for 5 minutes at RT with Biocare's DAB – OR –

Incubate for 5-7 minutes at RT with Warp Red.

Counterstain:

Counterstain with hematoxylin. Rinse with deionized water. Apply Tacha's Bluing Solution for 1 minute. Rinse with deionized water.

Technical Note:

1. This antibody, for intellIPATH FLX and manual use, has been standardized with MACH 4 detection system. Use TBS for washing steps.
2. This clone demonstrates a weak protein expression in endothelial cells.

 Biocare Medical
60 Berry Drive
Facheco, CA 94553
USA



 EMERGO EUROPE
Prinsesgracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-6080

PD-L1

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3171-102620

BIOCARE
M E D I C A L

Protocol Recommendations (ONCORE™ Pro Automated Slide Staining System):

OPA13171 is intended for use with the ONCORE Pro. Refer to the User Manual for specific instructions for use. Protocol parameters in the Protocol Editor should be programmed as follows:

Protocol Name: PD-L1 Rb

Protocol Template (Description): Rabbit HRP Template 1

Dewaxing (DS Buffer Option): DS2-50

Antigen Retrieval (AR Option): AR2, low pH; 101°C

Block Option: Buffer

Reagent Name, Time, Temp.: PD-L1 Rb, 30 min., 25°C

Protocol Recommendations (Ventana BenchMark ULTRA):

AVI3171 is intended for use with the BenchMark ULTRA. Refer to the User Manual for specific instructions for use. Recommended protocol parameters are as follows:

Template/Detection: OptiView DAB IHC

Pretreatment Protocol: CC1 64 minutes

Peroxidase: Pre Primary Peroxidase Inhibitor

Primary Antibody: 60 minutes, 36°C

Limitations:

The optimum antibody dilution and protocols for a specific application can vary. These include, but are not limited to fixation, heat-retrieval method, incubation times, tissue section thickness and detection kit used. Due to the superior sensitivity of these unique reagents, the recommended incubation times and titers listed are not applicable to other detection systems, as results may vary. The data sheet recommendations and protocols are based on exclusive use of Biocare products. Ultimately, it is the responsibility of the investigator to determine optimal conditions.

Quality Control:

Refer to CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011

Precautions:

1. This antibody contains less than 0.1% sodium azide. Concentrations less than 0.1% are not reportable hazardous materials according to U.S. 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communication and EC Directive 91/155/EC. Sodium azide (NaN₃) used as a preservative is toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build-up in plumbing. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976) (8)
2. Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. (9)
3. Microbial contamination of reagents may result in an increase in nonspecific staining.
4. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. The user must validate any such change.
5. Do not use reagent after the expiration date printed on the vial.
6. The SDS is available upon request and is located at <http://biocare.net>.

Troubleshooting:

Follow the antibody specific protocol recommendations according to data sheet provided. If atypical results occur, contact Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002.

References:

1. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Halle ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol.* 2014 Oct 15;193 (8):3835-41.
2. Tokito T, et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer.* 2016 Jan 6;55:7-14.
3. Park IH, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating lymphocytes in association with programmed death ligand 1 expression in early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2016 Feb;16(1):51-8.
4. Kakavand H, et al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol.* 2015 Dec;28 (12):1535-44.
5. Xia B, Herbst RS. Immune checkpoint therapy for non-small-cell lung cancer: an update. *Immunotherapy.* 2016;8(3):279-98.
6. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015 Apr;14(4):847-56.
7. Singh BP, Salama AK. Updates in therapy for advanced melanoma. *Cancers (Basel).* 2016 Jan 15;8(1).
8. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.

VP Echelon Series antibodies are developed solely by Biocare Medical LLC and do not imply approval or endorsement of Biocare's antibodies by Ventana Medical Systems, Inc. Biocare and Ventana are not affiliated, associated or related in any way. Ventana®, BenchMark®, ultraView and OptiView are trademarks of Roche.

 Biocare Medical
60 Berry Drive
Folsom, CA 94503
USA



 EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-403-8080