

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**PERFIL DE EXPRESIÓN DE PD-L1 EN MELANOMA
ACRAL CON DISTINTAS CLONAS DE
INMUNOHISTOQUÍMICA**

TESIS

Dr. Edwards Alejandro Rodríguez Hinojosa

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO

“DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”

SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



**PERFIL DE EXPRESIÓN DE PD-L1 EN MELANOMA
ACRAL CON DISTINTAS CLONAS DE
INMUNOHISTOQUÍMICA**

PRESENTA

Dr. Edwards Alejandro Rodríguez Hinojosa

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA
EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

DIRECTOR: DR. RODOLFO FRANCO MÁRQUEZ.

CO DIRECTOR: DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA

MONTERREY, N.L., MÉXICO

FEBRERO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO
“DR. JOSE ELEUTERIO GONZÁLEZ”
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA

PERFIL DE EXPRESIÓN DE PD-L1 EN MELANOMA ACRAL CON DISTINTAS
CLONAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

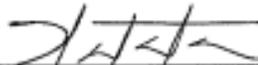
Aprobación de tesis



Dr. Rodolfo Franco Márquez
Director de tesis



Dr. Med. Oralia Barboza Quintana
Co director de tesis



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de enseñanza



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe de Servicio



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE PD-L1 EN MELANOMA ACRAL CON DISTINTAS
CLONAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA**

PRESENTADO POR:

DR. EDWARS ALEJANDRO RODRÍGUEZ HINOJOSA

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y
CITOPATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSE ELEUTERIO
GONZALEZ" BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RODOLFO FRANCO MÁRQUEZ Y LA CO
DIRECCION DE LA DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA.



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

FEBRERO, 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia, en especial a mi abuelo Franco, por su apoyo incondicional estos 4 años de residencia.

A todos mis amigos, quienes han estado ahí cuando los he necesitado, y con quiénes sé que puedo contar en todo momento.

A todos mis maestros, quienes me han guiado en el difícil mundo de la Patología, cada uno de ellos me ha aportado un conocimiento invaluable, tanto para la vida diaria, así como futuro patólogo.

A todos mis compañeros residentes, en especial a Max e Itzel, a quienes considero grandes amigos, y gracias a los cuales se hizo más llevadera esta etapa.

Por último, pero no por eso menos importante, agradezco a las secretarías, técnicos y todo el personal involucrado, por su apoyo desinteresado, sin los cuales no hubiera podido concluir este proyecto.

¡Muchas gracias a todos!

CONTENIDO

1. Resumen	7
2. Marco teórico	9
3. Antecedentes	17
4. Justificación	20
5. Objetivos	
a. Objetivo primario	21
b. Objetivo secundario	21
6. Hipótesis	22
7. Material y métodos	23
8. Resultados	28
9. Discusión	42
10. Conclusiones	45
11. Referencias	46

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO:

El melanoma corresponde a una de las variedades de cáncer de piel más agresivas. En la actualidad el uso de inmunoterapia dirigida al bloqueo de la vía de la proteína de muerte celular programada 1 y su ligando (PD-1/PD-L1) corresponde a una de las piedras angulares de tratamiento por lo que resulta de utilidad conocer su estatus en estos pacientes de manera que ayuda a seleccionar a quienes responderían con mayor probabilidad a esta terapia.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la expresión por inmunohistoquímica de PD-L1 en melanoma acral primario, utilizando distintas 4 diferentes clonas (SP142, SP263, 28-8,22-3) y valorando la concordancia que presentan entre ellas. De manera secundaria se buscó una relación entre la positividad de estas con características clinicopatológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó una búsqueda retrospectiva de casos en un período que abarcó del año 2010 a 2021 con diagnóstico de melanoma acral primario en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, obteniendo un total de 47 casos que cumplieran con los criterios de inclusión. Se elaboró una base de datos con todas las características clinicopatológicas. Se selecciono un área representativa de cada caso para la construcción de histoarreglos mediante equipo automatizado TMA Master II. Posteriormente se realizó la inmunotinción con cuatro diferentes anticuerpos monoclonales para PD-L1, Ventana SP142, Ventana SP263, Abcam 28-8 y Dako 22C3. Se evaluó por un patólogo experto la expresión de cada uno de los marcadores anti-PD-L1 únicamente en células tumorales, considerando como positivo cualquier expresión mayor al 1% en cualquier intensidad.

RESULTADOS:

La positividad para cada una de las clonas en los casos de melanoma acral fue variable, alcanzando una positividad del 15% para la clona SP142, un 21% para la clona SP263, un 26% para la clona 28-8 y un 19% para la clona 22C3.

Se observó un perfil de positividad entre clonas similar, encontrando una concordancia entre ellas de moderada a buena (Coeficiente Phi 0.41 a 0.66); siendo las clonas SP263 y SP142 las que presentaron mayor tasa de concordancia, y las clonas 22C3 y SP263 las que presentaron la menor concordancia.

Se realizó un análisis con comparaciones múltiples evaluando predictores clinicopatológicos con relación a la expresión (positividad) de las diversas clonas, sin observar diferencias estadísticamente significativas en este aspecto

CONCLUSIONES:

Si bien sabemos que clínicamente las diferentes clonas de PD-L1 no se intercambiables, al menos su positividad por inmunohistoquímica en melanoma acral podría considerarse equivalente, ya que en este estudio mostraron un perfil similar, mostrando no ser algún marcador superior a otro.

No existió una relación significativa entre características clinicopatológicas y la positividad de las diferentes clonas de PD-L1 realizadas.

Palabras clave: Melanoma acral, inmunohistoquímica, PD-L1, 22C3, 28-8, SP142, SP263

MARCO TEÓRICO

Introducción.

El cáncer de piel es sin duda una de las neoplasias más comunes a nivel mundial, de los distintos tipos histológicos que existen, el melanoma representa la menos frecuente; sin embargo, resalta por ser la más agresiva y letal de ellas.

En el año 2020 a nivel mundial se reportaron según el GLOBOCAN 324,635 nuevos casos, y 57,043 fallecimientos por el mismo (1); mientras que en México se reportaron en el mismo año 2,051 casos nuevos, y 773 muertes registradas por este padecimiento, según la misma institución (2).

Clasificación histológica.

La clasificación histológica de melanoma más reciente está dada por el libro azul Clasificación de los Tumores de la Piel de la Organización Mundial de la Salud de 2018 (WHO Classification of Skin Tumours, título original en idioma inglés), la cual se trata de una clasificación multidimensional basada en 3 aspectos principales: el papel de la radiación ultravioleta (UV), la célula (o tejido) de origen, y las alteraciones genómicas características recurrentes (3).

Conforme a lo anterior se agruparon en Melanomas que surgen en piel expuesta al sol, y Melanomas que surgen en sitio protegidos del sol o sin asociación etiológica conocida con la exposición a la radiación ultravioleta. La clasificación actual se encuentra resumida en la Tabla 1.

Tabla 1.- Clasificación histopatológica de melanoma.

Extensión del daño por radiación UV		Subtipo
Melanomas originados en piel con exposición solar	Melanomas con daño solar acumulado bajo	Melanoma de extensión superficial.
		Melanoma nodular con daño solar acumulado bajo.
	Melanomas con daño solar acumulado alto	Lentigo maligno melanoma.
		Melanoma nodular con daño solar acumulado alto.
		Melanoma desmoplásico.
Melanomas originados en piel protegida de exposición solar, o sin asociación etiológica conocida con exposición a radiación UV.		Melanoma Spitz.
		Melanoma acral (incluyendo melanoma nodular en piel acral).
		Melanoma de mucosas
		Melanoma originado en nevo congénito.
		Melanoma originado en nevo azul.
		Melanoma uveal.

El melanoma muestra diferencias en cuanto a su incidencia, mortalidad, perfil genético, y sitio de la lesión, dependiendo de diferentes factores como la etnia o el país de residencia. Esta neoplasia muestra una mayor incidencia en países con población caucásica, siendo el subtipo histológico más frecuente el Melanoma de extensión superficial. Por el otro lado presenta una menor incidencia en el sureste asiático, población afroamericana e hispanos; predominando en ellos los melanomas no asociados a exposición solar, siendo el subtipo más común el Melanoma acral. (4).

México no es la excepción a lo anterior, puesto que según estudios locales representa el subtipo más común en nuestra población. (5).

Melanoma acral.

El melanoma acral se define como aquel melanoma que ocurre en la piel acral glabra (desprovista de vello), tal como la piel de las palmas, plantas y aparato ungueal.

En esta variedad histológica no se conoce relación etiológica con la exposición a radiación UV, puesto que estas lesiones no suelen mostrar daño solar en su trasfondo; existe evidencia de que podría estar relacionado a traumas crónicos, sin embargo, esto no ha sido esclarecido con certeza. Se considera una neoplasia genómicamente inestable.

En la clínica, estas lesiones se caracterizan por ser grandes parches, asimétricos y con pigmentación oscura, localizados en sitios acrales, los cuales suelen tener una evolución a lo largo de meses o años, esto correspondiendo a la variedad lentiginosa; por otro lado, puede presentarse como un nódulo grande, sin presentar parche pigmentado periférico, correspondiente a la variedad nodular. Finalmente, la presentación subungueal suele presentarse como melanoniquia longitudinal (3,6,7).

En cuanto a los hallazgos histopatológicos, el subtipo más común de melanoma acral es la forma lentiginosa, seguido de la forma nodular y de extensión superficial. El primero consiste en una proliferación de melanocitos malignos a lo largo de la porción basal de la epidermis (fase de crecimiento radial), los cuales a lo largo del tiempo presentan un crecimiento invasivo y tumorogénico (fase de crecimiento vertical) (Figura 1). La forma nodular es similar a la fase vertical de crecimiento de la forma lentiginosa, sin embargo, suele carecer de un marcado incremento en el número de melanocitos perilesional (Figura 2). La forma de extensión superficial es similar a la encontrada en otros sitios, y está caracterizada por una proliferación dérmica de melanocitos malignos con características similares a su componente epidérmico in situ (Figura 3) (3).

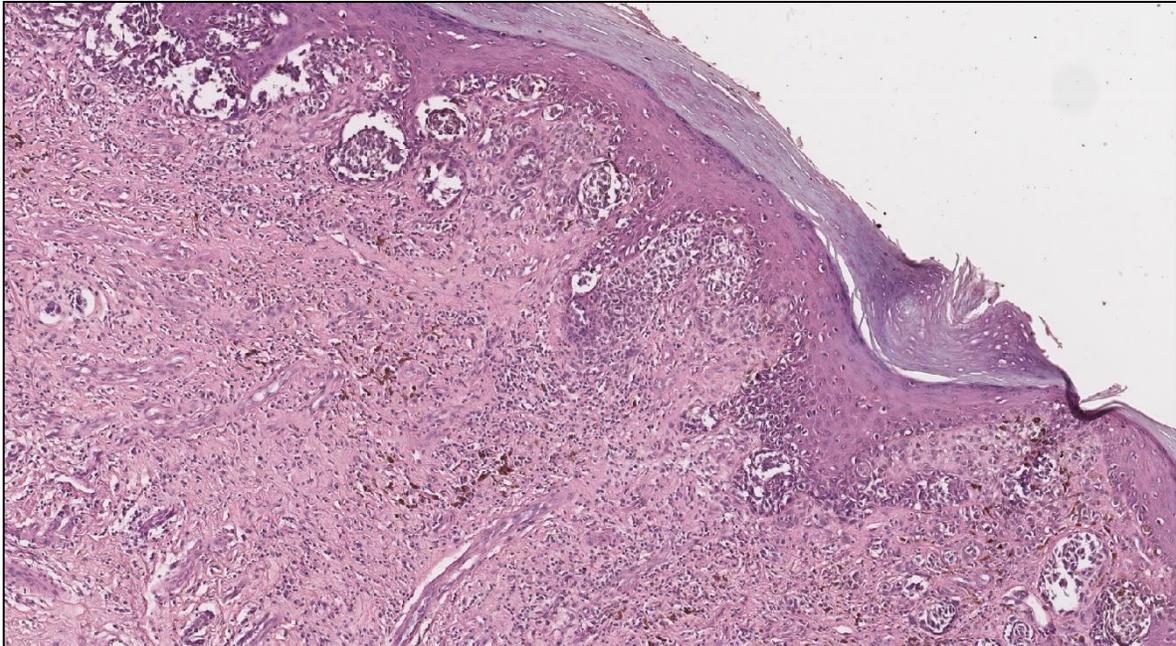


Figura 1. Melanoma acral; subtipo acral lentiginoso, muestra una proliferación de melanocitos malignos a lo largo de la capa basal epidérmica.

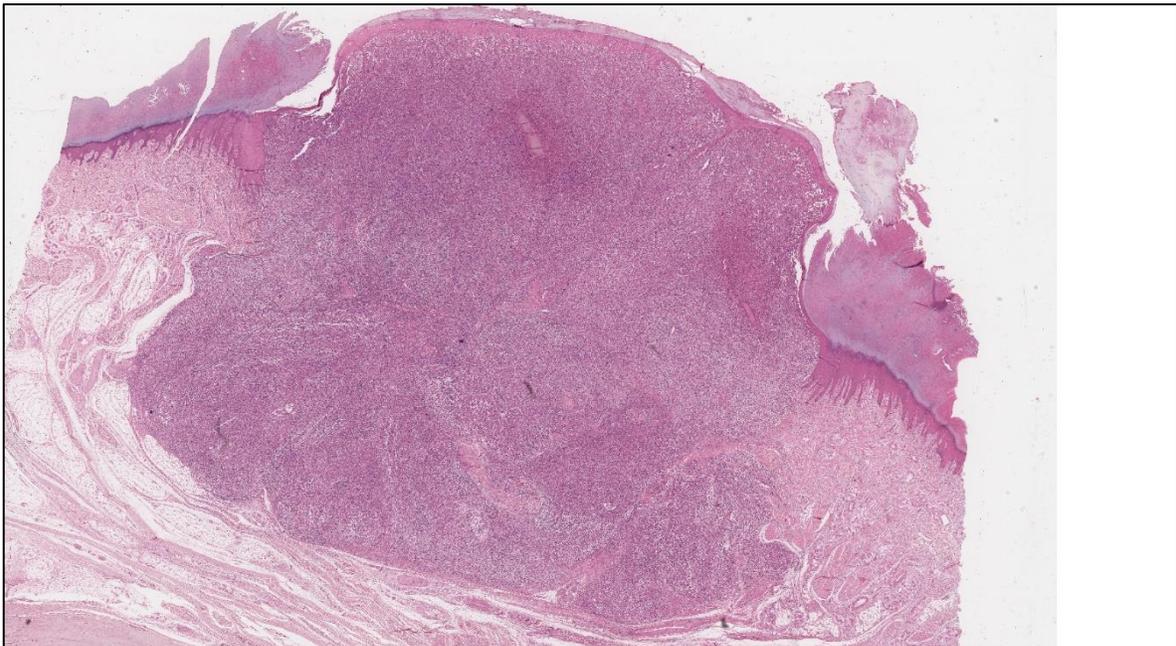


Figura 2. Melanoma acral; subtipo nodular, muestra una gran proliferación tumoral predominantemente dérmica, mayor al componente epidérmico, con mínimo involucro perilesional.

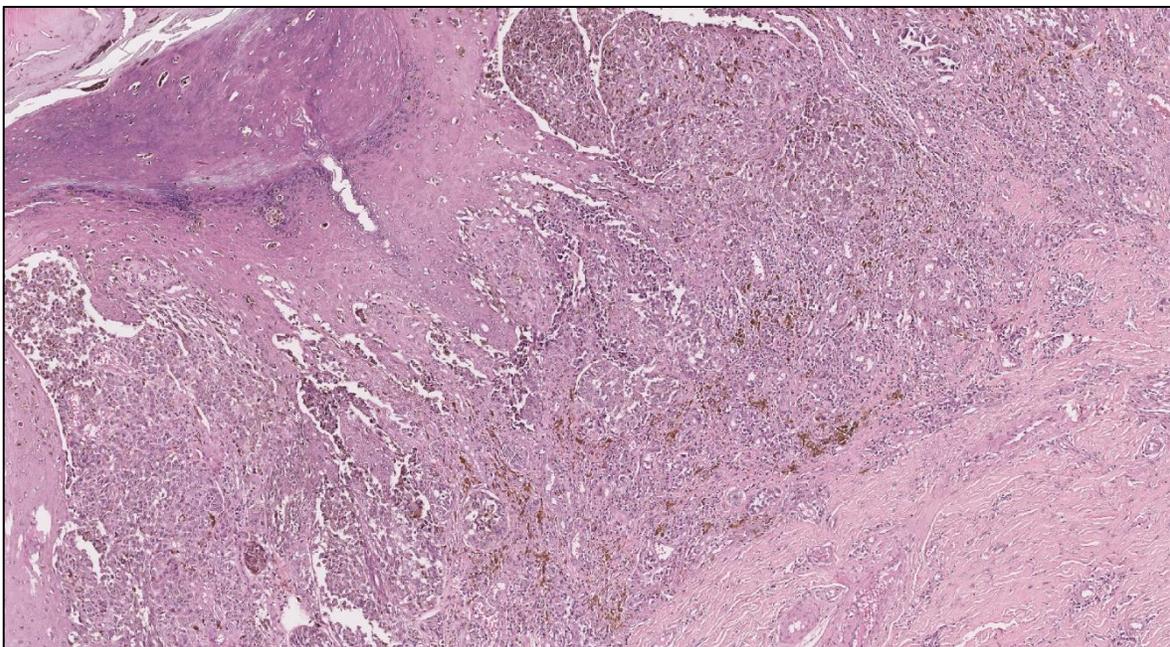


Figura 3. Melanoma acral, subtipo extensión superficial, muestra un componente dérmico invasor con apariencia citológica parecida al componente intraepidérmico el cual presente una distribución pagetoide.

Proteína de Muerte Celular Programada 1/ Ligando de Muerte Celular Programada 1 (Vía PD-1/PD-L1).

PD-L1 es una proteína transmembrana de tipo 1, la cual es codificada por el gen PDCDL1 en el cromosoma 9 la cual presenta un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una pequeña porción citoplásmica. Su expresión puede ser constituida, como en los linfocitos en reposo, cornea, placenta, entre otros, en donde juega un papel en la regulación de la respuesta proinflamatoria; o por otra parte puede ser inducida, siendo sobre expresado en diversas neoplasias a través de diferentes mecanismos (8).

La función de esta proteína depende de su unión al receptor transmembrana PD-1, codificado por el gen PDCD1, el cual es expresado de manera normal en linfocitos y células mieloides. La unión de ambos resulta en una acción co-inhibitoria que regula la actividad de células T (9).

De manera fisiológica esta interacción PD-1/PD-1 juega un rol importante en el desarrollo de la tolerancia inmune y agotamiento inmunológico; evitando así la destrucción de tejidos en una respuesta inflamatoria o la autoinmunidad.

En la oncogénesis, PD-L1 es clave en la atenuación de la respuesta inmune del huésped hacia las células neoplásicas. Bajo este concepto la vía PD-1/PD-L1 es la responsable de la evasión de las células malignas a la respuesta inmune (Figura.4). (10).

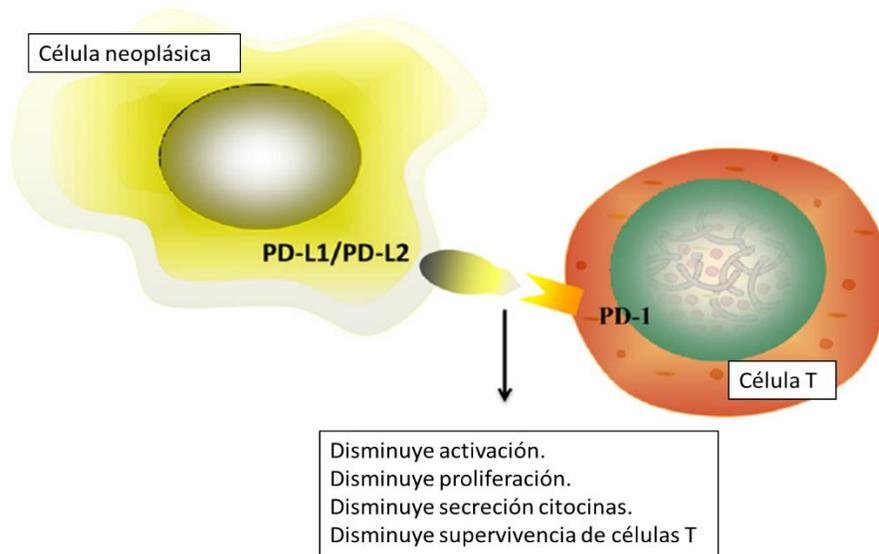


Figura 4. La vía PD-1/PD-L1 inhibe la activación, proliferación, supervivencia y secreción citotóxica de las células T dentro de la neoplasia.

PD-L1 en distintas neoplasias.

Diversos tipos de cáncer han desarrollado mecanismos que les permiten expresar altos niveles de PD-L1 en la superficie de células neoplásicas, lo que les permite unirse a su receptor en células T activadas, desencadenando la vía de señalización PD-L1/PD-1, logrando inactivarlas y llevándolas a un agotamiento clonal. De esta manera las células neoplásicas logran escapar a la respuesta inmune, lo que les permite proliferar sin cesar (9,11).

El bloqueo de esta vía (PD-1/PDL1) con inmunoterapia ha ganado aceptación como estrategia terapéutica, en diversas neoplasias.

La expresión de PD-L1 ha sido demostrada por inmunohistoquímica en diversas neoplasias, tanto en las células tumorales, así como en las células inmunes infiltrantes. Entre estas neoplasias se encuentra el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, melanoma, entre otras.

PD-L1, clonas y medicamentos disponibles.

Actualmente existen 5 agentes terapéuticos en el mercado aprobados, los cuales están dirigidos al bloqueo de esta vía; dos de estos (nivolumab y pembrolizumab) son anticuerpos dirigidos contra el receptor PD-1, y tres anticuerpos dirigidos al receptor de PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab). Cada uno de ellos se une a distintos epítopes en su respectivo blanco, y por tanto cada uno presenta un distinto patrón inmunogénico (Figura 5) (11).

Para lo anterior se han desarrollado diversos ensayos del biomarcador PD-L1 que encajan en estos cinco puntos de control inmune; desarrollados por distintas compañías, se ejecutan en diferentes plataformas de análisis, y que requieren su propio estudio de validación con diferentes métodos de puntuación. (11,12).

Existen diferentes ensayos de inmunohistoquímica disponibles para la valoración de PD-L1, que sirven para identificar aquellos pacientes que se beneficiarían mayormente de inhibidores de esta vía. Para cada agente farmacéutico, se utiliza clonas específicas, plataformas de tinción y métodos distintos de evaluación (12).

Clona 22C3 (Dako): Prueba diagnóstica para tratamiento con pembrolizumab, utiliza anticuerpo murino monoclonal anti-PD-L1. Se corre en la plataforma Dako Autostainer Link 48. Se valoran todas las células tumorales viables.

Clona 28-8 (Dako): Prueba diagnóstica complementaria para tratamiento con nivolumab, utiliza anticuerpo de conejo monoclonal. Se corre con la plataforma Dako Autostainer Link48.

Clona SP142 (Ventana): Prueba diagnóstica para tratamiento con atezolizumab, utiliza anticuerpo de conejo monoclonal. Se recomienda la plataforma Ventana BenchMark Ultra.

Clona 263 (Ventana): Prueba diagnóstica para tratamiento de distintos fármacos, utiliza anticuerpo de conejo monoclonal. Se recomienda la plataforma de Ventana BenchMark Ultra.

Clona 73-10 (Dako): Prueba diagnóstica en ensayos para avelumab, usa la plataforma de Dako Autostainer Link48.

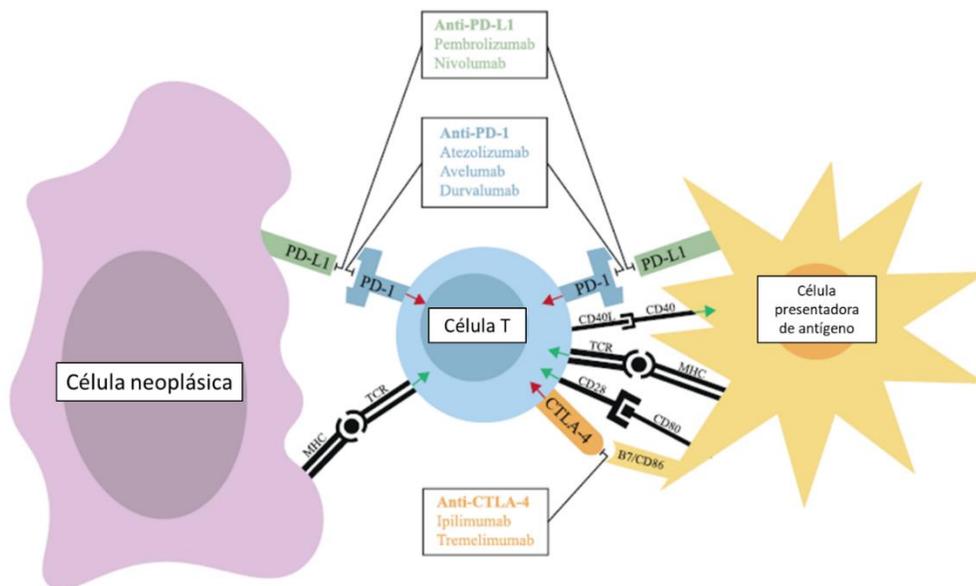


Figura 5. Sitios de acción de los bloqueadores de PD-1/ PD-L1 (12).

Tabla 2. Resumen de cada una de las clonas disponibles

Anticuerpo	Compañía	Plataforma	Sistema de detección	de	Medicamento de la compañía
22C3	Dako	Dako autostainer Link48	Dako Linker		Pembrolizumab
28-8	Dako	Dako autostainer Link48	Dako Linker		Nivolumab
73-10	Dako	Dako autostainer Link48	Dako Linker		Avelumab
SP142	Ventana	Ventana BenchMark	OptiView		Atezolizumab
SP263	Ventana	Ventana BenchMark	OptiView		Durvalumab

ANTECEDENTES

PD-L1 en melanoma y sus variedades histológicas.

El melanoma independiente de su variedad histológica se considera una neoplasia inmunogénica; uno de los primeros estudios en reconocer la asociación entre la expresión de PD-L1, la falta de respuesta del huésped para el control del crecimiento tumoral y la presencia de linfocitos fue el de Taube et al (13). Describió como a pesar de que el huésped mostraba una respuesta inmune al tumor, muchas veces éste fallaba en controlar su crecimiento y progresaba la enfermedad, además describió la relación que existía entre este hecho y la expresión de PD-L1.

En la actualidad el uso de inmunoterapia en melanoma dirigida contra el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 representa la piedra angular de tratamiento en enfermedad avanzada, sola o en combinación con otros fármacos, por lo que resulta importante conocer el estatus de PD-L1 en estos pacientes puesto es un factor predictivo de respuesta a terapia (14).

En diversas cohortes la positividad para el marcador de PD-L1 en melanoma en general, ronda aproximadamente entre el 30% y 35%, tal como es el estudio de Kaunitz y colaboradores, quienes identificaron una variabilidad en la prevalencia de positividad, así como en los patrones y niveles de expresión en las diferentes variedades de melanoma, utilizando la clona 5H1. Hablando en específico, ellos encontraron un mayor porcentaje de positividad en los melanomas de extensión superficial (daño solar acumulado) con un 62%, y la menor proporción de casos positivos en melanomas uveales, tan solo con un 10%. Con respecto al melanoma acral encontraron un 31% de casos positivos, y respecto al resto estos mostraron menores niveles de expresión del marcador (15).

PD-L1 y pronóstico.

En cuanto al valor pronóstico del marcador de PD-L1 es inconsistente y sigue sin ser claro, existiendo hallazgos contradictorios. Por su parte existe literatura en donde se ha asociado la expresión de PD-L1 en melanoma metastásico a un peor pronóstico como el estudio de Madore y colaboradores (16), mientras que otros estudios han encontrado una mayor sobrevida asociado a la positividad del marcador, de igual manera en enfermedad avanzada, como el estudio de Danilova y colaboradores (17), o el estudio de Obeid y colaboradores. (18).

PD-L1 valorado con diferentes clonas de inmunohistoquímica en melanoma.

Como mencione de manera detallada anteriormente, existen diversas clonas para el marcador de inmunohistoquímica para PD-L1, fabricadas por distintas compañías, diseñadas para diferentes plataformas, con diferentes métodos de valoración, etc.; este paradigma de “Un anticuerpo – un fármaco”, ha planteado numerosas dudas en el personal de salud sobre la intercambiabilidad de estos.

El estudio de Sunshine y colaboradores, comparo diferentes clonas disponibles del marcador de inmunohistoquímica para PD-L1 (5H1, SP142, SP263, 28-8, 22-C3), utilizando plataformas y metodología estandarizada por su laboratorio, sin la utilización de los kits comerciales, encontrando un desempeño similar entre todos los diferentes anticuerpos utilizados, presentando una mayor concordancia las clonas SP142 y SP263 (19).

PD-L1 en melanoma acral primario.

Existen pocos estudios que se centren en valorar la prevalencia y patrones de expresión de PD-L1 en melanoma acral primario, uno de ellos es el estudio de Ren y colaboradores, cuyo objetivo era valorar la relevancia clínica de la positividad de PD-L1, utilizando la clona 3F2.1, dividiendo los casos en bajos (62.8%) y altos expresores (37.2%), encontrando únicamente una asociación

significativa entre la expresión de PD-L1 en linfocitos infiltrando al tumor (TIL), y una peor sobrevida libre de enfermedad (20).

JUSTIFICACIÓN

Gran parte de la literatura con la que se cuenta actualmente sobre la expresión de PD-L1 en melanoma, esta basada primordialmente en pacientes de raza caucásica, en donde la variedad histológica más común corresponde al Melanoma con daño solar acumulado bajo (Melanoma de extensión superficial), mientras que en nuestra población la variedad histológica predominante es el Melanoma acral. A su vez la mayor parte de ella esta enfocada a enfermedad avanzada metastásica puesto que es cuando cobra mayor relevancia valorar el estatus del PD-L1.

Existe poca literatura que estudie a detalle y compare el perfil de expresión de PD-L1 utilizando diferentes clonas.

No existen artículos actualmente que estudien la expresión de las diferentes clonas de inmunohistoquímica para PD-L1 en melanoma acral primario.

Poca literatura correlaciona la expresión de PD-L1 con parámetros clinicopatológicos, encontrando 1 solo artículo, el cual se limito a un solo anticuerpo anti-PD-L1.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir el perfil de expresión del marcador de inmunohistoquímica de PD-L1 en casos de melanoma acral primario utilizando las distintas clonas (SP142, SP263, 28-8, 22C3) con las que se cuentan actualmente en el servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL y realizar una comparación entre ellas.

Objetivos secundarios:

- Definir si existe una relación entre el patrón de expresión de PD-L1 de las diferentes clonas, y los distintos parámetros clinicopatológicos (sexo, edad, medida de Breslow, nivel de Clark, presencia de ulceración, presencia de datos de regresión, invasión perineural, invasión angiolinfática, presencia de linfocitos infiltrando el tumor, estadio patológico).
- Establecer una base de datos con todos los parámetros diagnósticos necesarios en melanoma acral de los casos que se encuentran en el archivo del servicio, según las últimas recomendaciones del College of American Pathologists.

HIPÓTESIS.

Existe un patrón de expresión específico para el marcador de PD-L1 por inmunohistoquímica para el melanoma acral utilizado las diferentes clonas (SP142, SP263, 28-8, 22C3) con las que se cuentan en el servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL.

Hipótesis nula:

No existe un patrón de expresión específico para el marcador de PD-L1 por inmunohistoquímica para el melanoma acral utilizado las distintas clonas (SP142, SP263, 28-8, 22C3) con las que se cuentan en el servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Tipo de estudio:

- Observacional
- Transversal.
- Descriptivo.
- Retrospectivo.

Población de estudio:

Todos los casos diagnosticados como melanoma acral que se encontraran en la base de datos del servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario, ya sea con material de pacientes de nuestra institución o casos que hayan sido enviados para revisión.

A.- Criterios de inclusión: Todos los casos con diagnóstico de melanoma acral ya sean biopsias o resecciones, que se encontraran en el archivo y que contaran con material disponible y suficiente para realizar los estudios de inmunohistoquímica.

B.- Criterios de exclusión: Cualquier variedad de melanoma distinta a melanoma acral, así como aquellos casos que no contaran con ningún material para realizar los estudios de inmunohistoquímica.

C.- Criterios de eliminación: Casos con diagnóstico de melanoma acral cuyo material fuera escaso o inadecuado para realizar estudios especiales adicionales.

El tamaño de la muestra fue a conveniencia del investigador, obteniendo inicialmente 58 casos (N). Posteriormente y de acuerdo con los criterios de

inclusión, exclusión y eliminación se alcanzaron 47 casos (n) que cumplieran con los mismos.

Descripción de la metodología del estudio:

Posterior a la aprobación por parte de la Coordinación de Control de Calidad en Investigación de nuestra institución, se realizó una búsqueda retrospectiva de casos en el sistema Pathox (TesiUpDate®) del servicio de Anatomía y Citopatología del Hospital Universitario José Eleuterio González, en un periodo de tiempo comprendido del año 2010 al 2021 de casos con diagnóstico de melanoma acral, ya sea en biopsias incisionales, excisionales y amputaciones.

Se realizó una base de datos de todos los casos, y posteriormente se procedió a la búsqueda y obtención del material, tanto de los bloques de tejido fijados en formalina y embebidos en parafina, así como de las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina.

Se valoró la cantidad de tejido disponible en cada caso, y el estado de este, para excluir aquellos casos con material insuficiente o no apto para estudios adicionales (defectos de fijación, defectos de decalcificación, entre otros), dichos casos fueron devueltos para su almacenamiento en el archivo.

Se identificaron 47 casos que cumplieran con las características adecuadas para incluirse en el estudio, según los lineamientos antes descritos. Dichos casos fueron valorados nuevamente para verificar el diagnóstico, así como para complementar la base de datos con los parámetros clínicopatológicos faltantes, según las recomendaciones actuales del Colegio de Patólogos Americanos (College of American Pathologist, en idioma original).

Posteriormente se seleccionó un área tumoral representativa y viable de cada caso, para la realización automatizada de histoarreglos de tejido a través del equipo TMA Master II de 3 mm de diámetro. En total se distribuyeron los 47 casos en 3 histoarreglos, en un orden previamente establecido, usado tejido renal como guía (Figura 6 y 7).



Figura 6. Ejemplo del resultado final de la construcción de uno de los bloques de parafina.

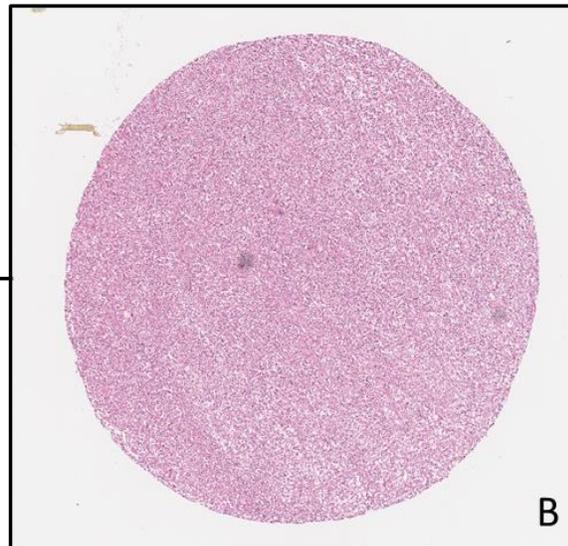
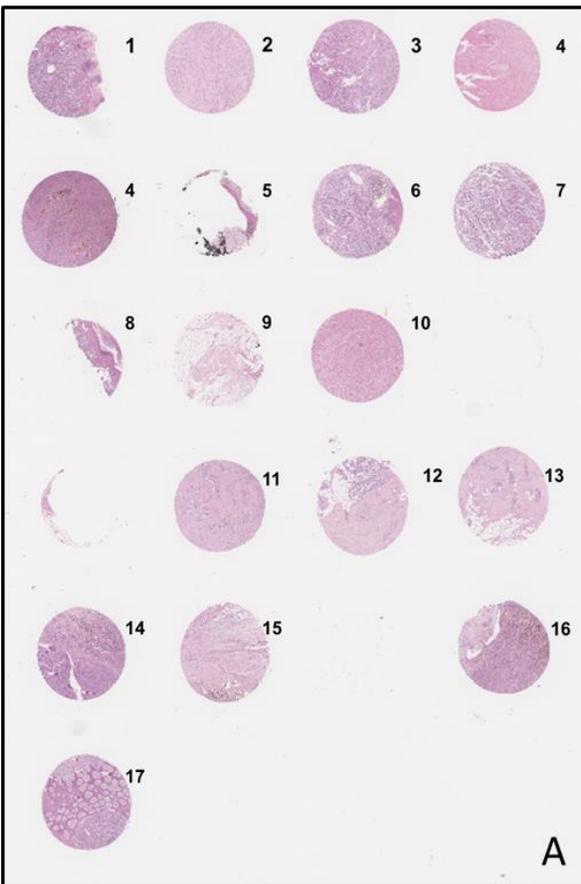


Figura 7. A) Corte histológico de uno de los histoarreglos teñidos con hematoxilina y eosina. B) Mayor acercamiento a uno de los casos.

Inmunohistoquímica.

La inmunotinci

ón se realizó con plataforma y metodología estandarizada previamente por nuestro laboratorio. Se utilizó el sistema de tinción de inmunohistoquímica automatizado Ventana BenchMark XT.

Se utilizaron los siguientes 4 anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y su dilución optimizada:

- Ventana SP142 (Dilución 1:3).
- Ventana SP263 (Dilución 1:50)
- Abcam 28-8 (Dilución 1:150).
- Dako 22C3 (Dilución 1:300)

Para todos los anticuerpos se utilizó la misma plataforma, y el sistema de detección OptiView; si bien estos no son los sugeridos por los fabricantes, dichos anticuerpos se encuentran estandarizados y armonizados para la plataforma con la que cuenta el servicio.

Interpretación

Se evaluó la expresión de cada uno de los marcadores anti-PD-L1 solo en células tumorales, considerando como positivo cualquier expresión (membranosa, citoplásmica o mixta) mayor o igual al 1%.

En todos los casos se utilizó como control externo positivo tejido de amígdala y placenta.

La interpretación de la tinción se realizó por un patólogo experto y se evaluó la intensidad y proporción para los casos que se consideraron positivos.

La intensidad se graduó en una escala visual en 1+ (intensidad leve), 2+ (intensidad moderada), 3+ (intensidad fuerte).

Se consideró como proporción el porcentaje de células tumorales que expresaron el marcador.

Análisis estadístico:

La estadística descriptiva se reportó con medidas de tendencia central, dispersión. Para variables cuantitativas, los valores normalmente y no normalmente distribuidos se reportaron en medias y medianas respectivamente. Para variables cualitativas, las proporciones se reportaron en porcentajes.

Para la hipótesis de trabajo de correlación de clonas, para valorar diferencia de proporciones se usó prueba McNemar, considerando significativo un valor de $p < 0.05$. En caso de observar frecuencias menores a 5 en la tabla de valores esperados para la hipótesis diferencia de proporciones, se utilizó prueba exacta de Fisher.

El análisis estadístico fue realizado utilizando el entorno de programación R v.4.1.0

RESULTADOS.

En total se incluyeron en el estudio 47 pacientes con diagnóstico de melanoma acral primario, cuyas características clinicopatológicas se resumen en la Tabla. 3, y se describen detalladamente a continuación.

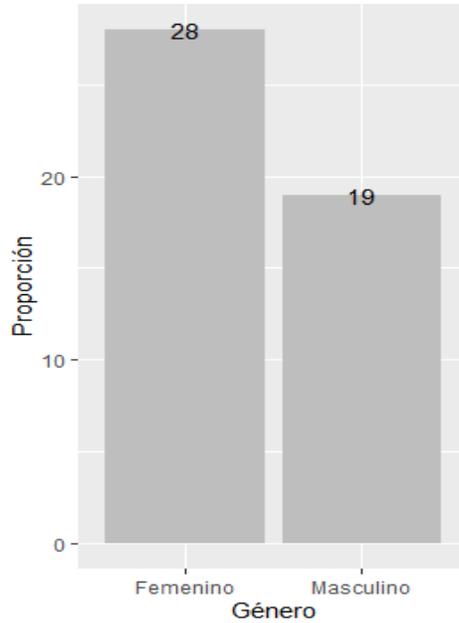
Tabla 3. Características clinicopatológicas (continúa en la siguiente página).

Variable	n, Proporción IC95%
Género	
Masculino	19, 0.4 [0.2725,0.5426]
Femenino	28, 0.6 [0.4574,0.7275]
Edad	
31-40	3, 0.06 [0.0133,0.1732]
41-50	6, 0.13 [0.0577,0.2582]
51-60	15, 0.32 [0.204,0.4632]
61-70	11, 0.23 [0.1313,0.3695]
>70	12, 0.26 [0.155,0.4013]
Localización	
Aparato ungueal	3, 0.06 [0.0133,0.1732]
Mano (Palma)	2, 0.04 [0.0025,0.147]
Pie (Planta)	42, 0.89 [0.7653,0.9558]
Medida de Breslow	
Menor o igual a 1 mm	5, 0.11 [0.0442,0.2347]
Mayor de 1 mm a 2 mm	9, 0.19 [0.1008,0.326]
Mayor de 2 mm a 4 mm	12, 0.26 [0.155,0.4013]
Mayor de 4 mm	21, 0.45 [0.3169,0.5906]
Nivel de Clark	
I	1, 0.02 [-0.0071,0.1196]
II	10, 0.21 [0.1159,0.3479]
III	6, 0.13 [0.0577,0.2582]
IV	17, 0.36 [0.2378,0.5033]
V	13, 0.28 [0.1711,0.4222]
Ulceración	
Presente	31, 0.66 [0.5166,0.7792]
Ausente	16, 0.34 [0.2208,0.4834]
Invasión angiolinfática	
Presente	27, 0.57 [0.4284,0.701]
Ausente	20, 0.43 [0.299,0.5716]
Invasión perineural	
Presente	35,0.74[0.5987,0.845]
Ausente	12,0.26[0.155,0.4013]

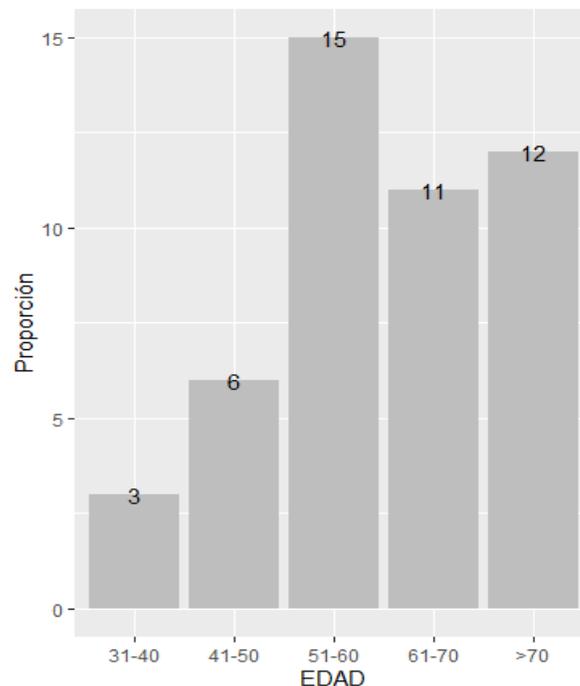
Datos Regresión	
Presente	2, 0.04 [0.0025,0.147]
Ausente	45, 0.96 [0.853,0.9975]
Microsatélites	
Presente	5, 0.11 [0.0442,0.2347]
Ausente	42, 0.89 [0.7653,0.9558]
Linfocitos Infiltrando el Tumor	
Ausentes	22, 0.47 [0.335,0.6095]
Presentes no enérgicos	19, 0.4 [0.2725,0.5426]
Presentes enérgicos	6, 0.13 [0.0577,0.2582]
pT	
1a	4, 0.09 [0.0313,0.2106]
1b	1, 0.02 [-0.0071,0.1196]
2a	5, 0.11 [0.0442,0.2347]
2b	5, 0.11 [0.0442,0.2347]
3a	5, 0.11 [0.0442,0.2347]
3b	6, 0.13 [0.0577,0.2582]
4a	1, 0.02 [-0.0071,0.1196]
4b	20, 0.43 [0.299,0.5716]
pN	
0	6, 0.13 [0.0577,0.2582]
1	2, 0.04 [0.0025,0.147]
2	7, 0.15 [0.0717,0.2812]
3	3, 0.06 [0.0133,0.1732]
X	29, 0.62 [0.4769,0.745]
pM	
1a	2, 0.04 [0.0025,0.147]
1b	1, 0.02 [-0.0071,0.1196]
1d	1, 0.02 [-0.0071,0.1196]
3	1, 0.02 [-0.0071,0.1196]
X	42, 0.89 [0.7653,0.9558]

Características clínicas:

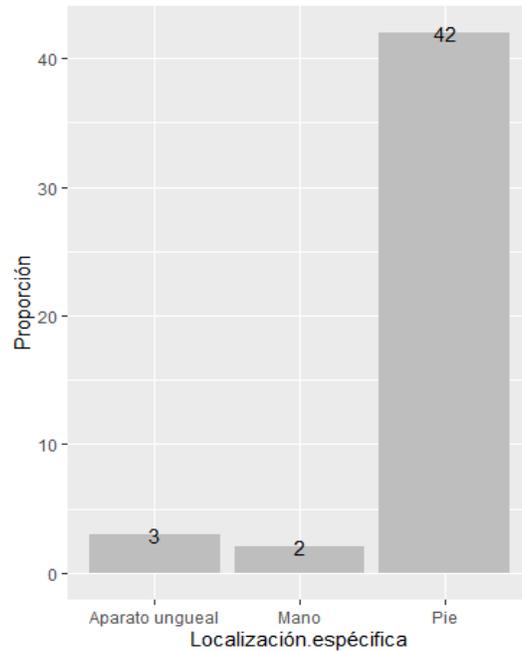
Del total de pacientes el 40% (19 casos) fueron hombres, y 60% (28 casos) mujeres.



La edad varió desde 32 años el paciente menor, hasta 86 años, se dividió en intervalos para mejor apreciación, encontrando en el intervalo de edad 31-40 años un total de 3 casos (6%), en el intervalo 41-50 años se encontraron 6 casos (13%), en el intervalo 51-60 años, se encontraron 15 casos (32%), en el intervalo de 61-70 años se encontraron 11 casos (23%), y en el intervalo de más de 70 años, se encontraron 12 casos (26%). El promedio de edad fue 60.5 años.

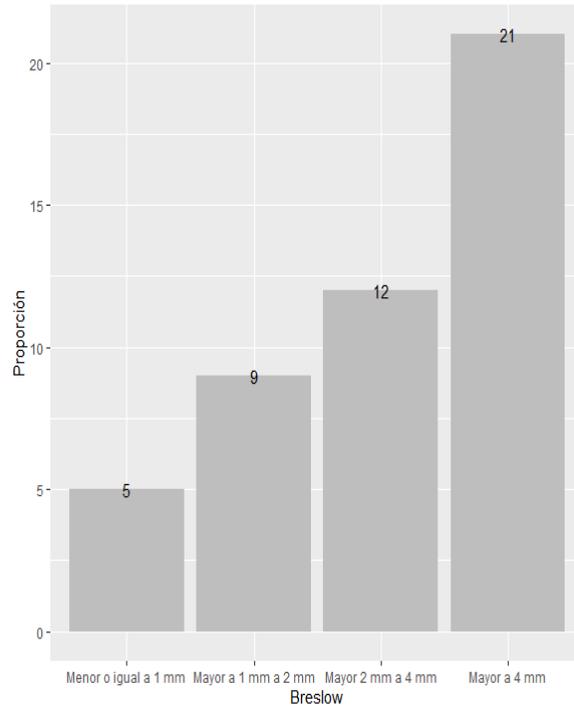


En cuanto a localización la mayor parte de las lesiones se localizaron en pies (plantas) con un 89.3% (42 casos), en aparato ungueal (manos y pies) 6.38% (3 casos), y en manos (palmas) un 4.25% (2 casos).

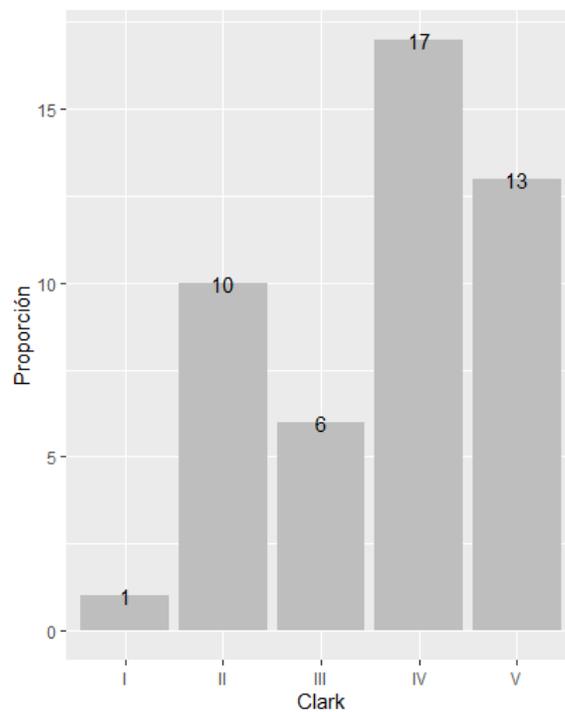


Características histopatológicas:

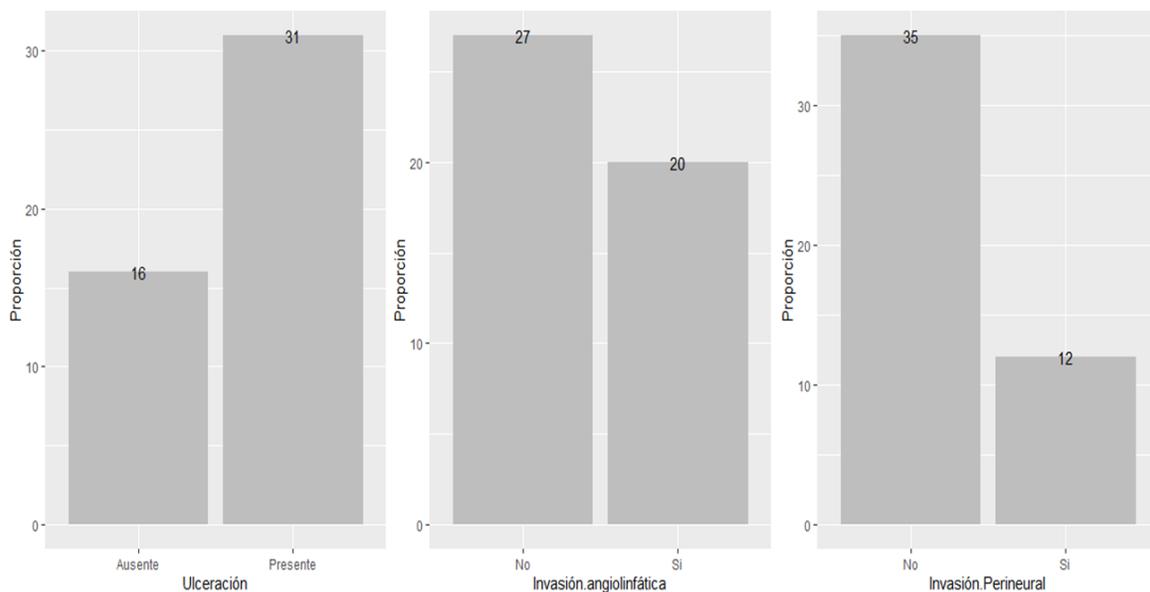
La medida de Breslow se dividió en 4 grupos para un análisis más sencillo, en el primer grupo con una medida menor o igual a 1 mm con un total de 5 casos (11%), en el siguiente grupo una medida mayor a 1 mm hasta 2 mm, con un total de 9 casos (19%), en el tercer grupo con una medida mayor a 2 mm hasta 4 mm con un total de 12 casos (26%), y en el último grupo con una medida mayor a 4 mm, fueron un total de 21 casos (45%). El promedio de medida de Breslow fue de 5.2 mm.



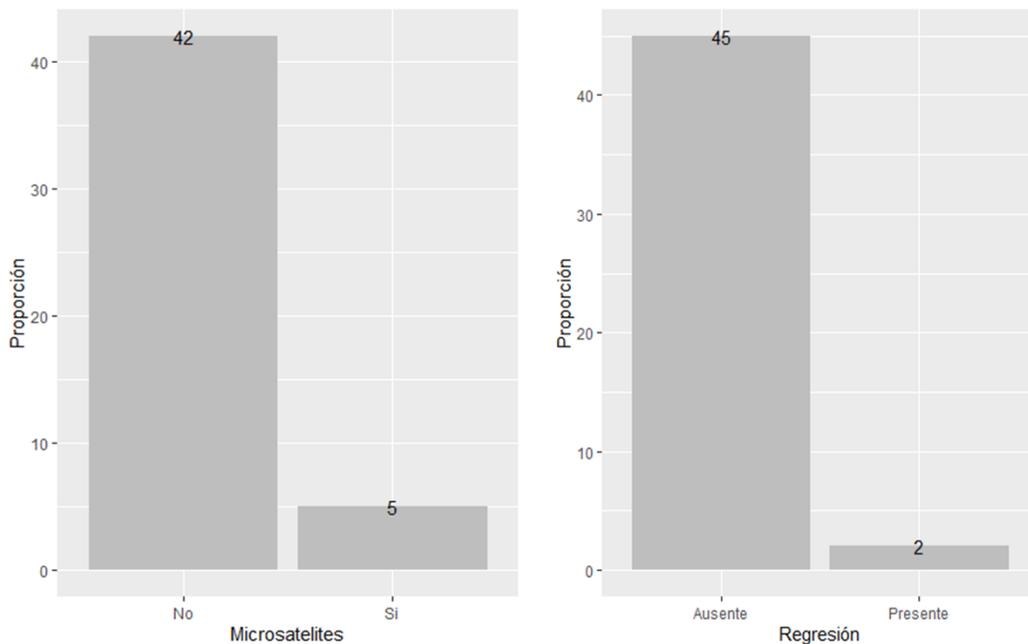
En cuanto al nivel de Clark, se encontraba en nivel I el 2% (1 caso), en nivel II el 21% (10 casos), en el nivel III un 13% (6 casos), en el nivel IV 36% (17 casos), y en el nivel V 28% (13 casos).



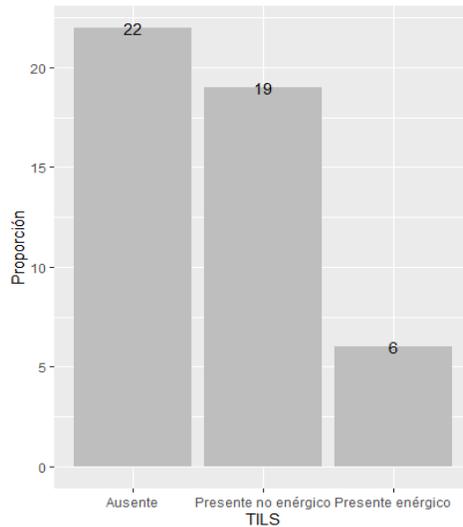
La ulceración estuvo presente en el 66% (31 casos) y ausente en 34% (16 casos). La invasión angiolinfática estuvo presente en el 57% (27 casos) y ausente en 43% (20 casos). La invasión perineural estuvo presente en el 74% (35 casos), y ausente en 26% (12 casos).



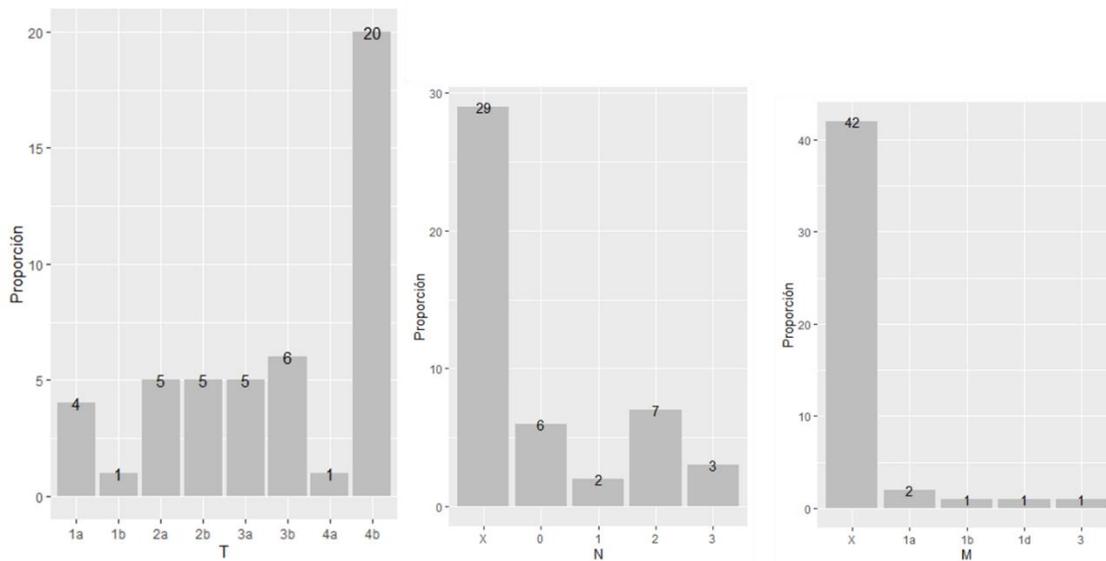
Los datos de regresión únicamente estuvieron presentes en 2 casos (4%) y los microsatélites en 5 casos (11%).



La presencia de linfocitos infiltrando el tumor (TIL's), estuvieron ausentes en 47% (22 casos), presentes de manera no enérgica en 40% (19 casos), y presentes de manera enérgica solo en el 13% (6 casos).



En cuanto al estadio patológico, el parámetro evaluable más constante fue la pT, puesto que en la mayor parte de los casos no se contaba con un muestreo de ganglios (pN), o no se tenía documentada alguna metástasis con estudio histopatológico (pM). En el parámetro pT en 1a se tuvieron 4 casos (9%), en 1b se tuvo un caso (2%), en 2a fueron 5 casos (11%), en 2b un total de 5 casos (11%), en 3a resultaron 5 casos (11%), en 3b con 6 casos (13%), en 4a solo un caso (2%), y por último en 4b con 20 casos (43%).



Inmunohistoquímica.

La positividad para cada una de las clonas en los casos de melanoma acral fue variable (Tabla 4), alcanzando una positividad del 15% para la clona SP142, un 21% para la clona SP263, un 26% para la clona 28-8 y un 19% para la clona 22C3.

La clona SP142 resultó positiva en 7 casos (15%), siendo la clona con menor porcentaje de positividad. La intensidad de positividad fue 1+ en 3 de los casos positivos; la positividad 2+ fue vista en 2 casos, y una intensidad 3+ en 2 casos igualmente.

La clona SP263 resultó positiva en 10 casos (21%), con una intensidad 1+ en 4 casos; una positividad 2+ se presentó en 5 casos; y solamente un caso presentó una intensidad 3+.

La clona 28-8 resultó positiva en 12 casos (26%), siendo la clona que mostró mayor proporción de casos positivos. Presentó una intensidad 1+ en 9 casos; mostró una intensidad 2+ en 3 casos; y ningún caso mostró una intensidad 3+ cuando fueron comparados contra el tejido control.

Por último, la clona 22C3 resultó positiva en 10 casos (21%), presentando una intensidad 1+ en 6 casos; una intensidad 2+ en un total de 4 casos; ningún caso mostró una intensidad 3+ cuando se comparo el problema contra el tejido control.

Tabla 4. Frecuencia e intensidad de positividad para las diferentes clonas de PD-L1.

SP142		SP263		28-8		22c3	
Variable	n, Proporción IC95%	Variable	n, Proporción IC95%	Variable	n, Proporción IC95%	Variable	n, Proporción IC95%
Positividad	7, 0.15 [0.0717,0.2812]	Positividad	10, 0.21 [0.1159,0.3479]	Positividad	12, 0.26 [0.155,0.4013]	Positividad	10, 0.21 [0.1159,0.3479]
Intensidad							
	n, Proporción IC95%		n, Proporción IC95%		n, Proporción IC95%		n, Proporción IC95%
0	40,0.85[0.7188,0.9283]	0	37,0.79[0.6521,0.8841]	0	35,0.74[0.5987,0.845]	0	37,0.79[0.6521,0.8841]
1+	3,0.06[0.0133,0.1732]	1+	4,0.09[0.0313,0.2106]	1+	9,0.19[0.1008,0.326]	1+	6,0.15 [0.0717,0.2812]
2+	2,0.04[0.0025,0.147]	2+	5,0.11[0.0442,0.2347]	2+	3,0.06[0.0133,0.1732]	2+	4,0.06 [0.0133,0.1732]
3+	2,0.04[0.0025,0.147]	3+	1,0.02[-0.0071,0.1196]	3+	0	3+	0

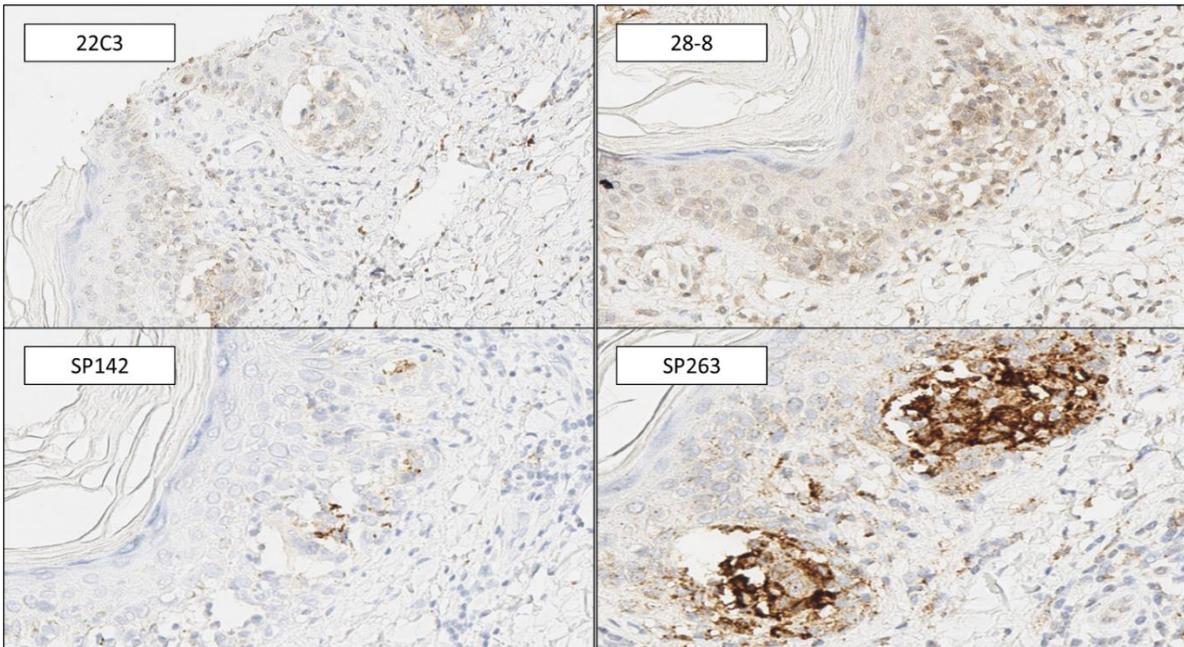
A continuación de muestra una serie de casos seleccionados, para ejemplificar algunas de las situaciones observadas durante la valoración de cada una de las clonas en los diferentes casos.

El primer ejemplo corresponde al escenario más común en este estudio, el cual fue la completa negatividad para todas las clonas evaluadas (22C3, 28-8, SP142, y SP263).



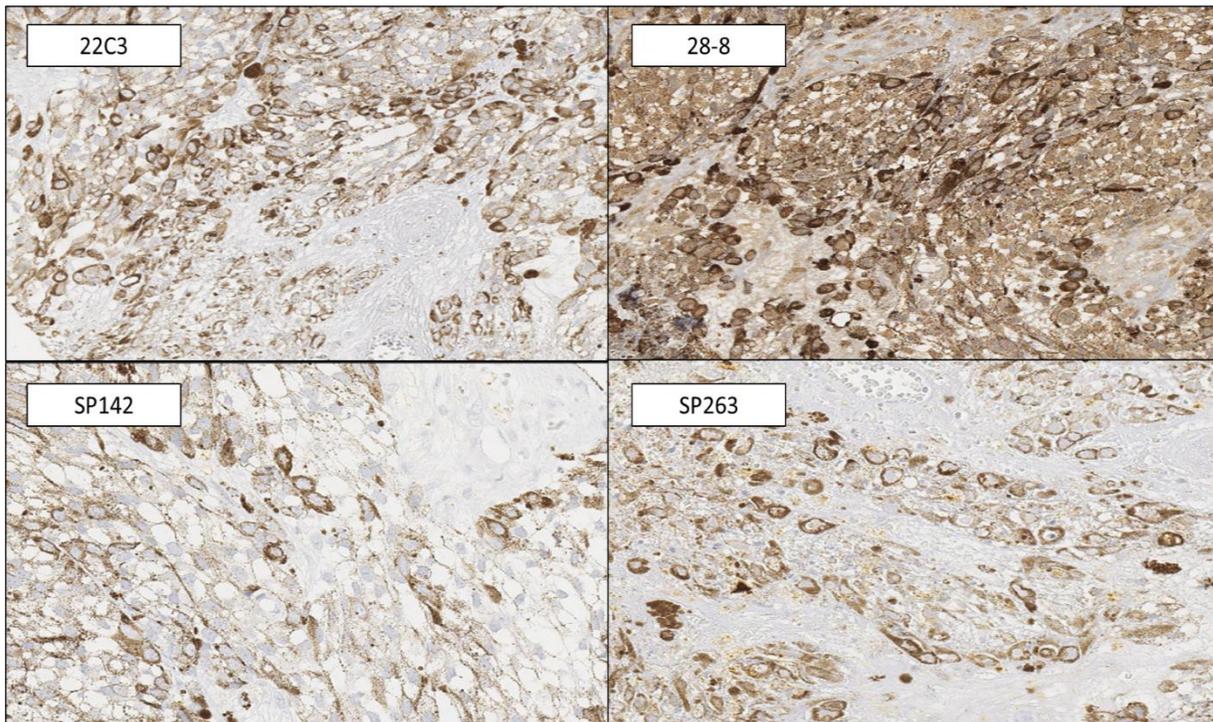
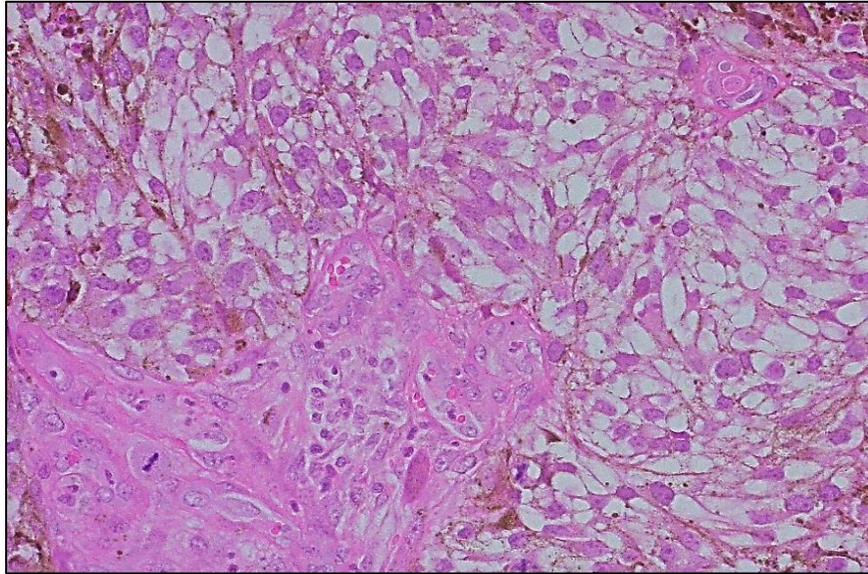
Ejemplo 1. El caso muestra negatividad para todas las clonas

Algunos casos llegaron a mostrar positividad para una o dos clonas, como en este segundo ejemplo en donde el componente tumoral epidérmico resultó positivo únicamente para una clona (SP263) y negativo para el resto de los anticuerpos (22C3, 28-8, SP142). Cabe resaltar que no hubo ningún caso que resultara positivo para 3 clonas.



Ejemplo 2. El caso resultó positivo para una sola clona.

Por último, otro escenario común fue la positividad de las células tumorales para todas las clonas realizada (22C3, 28-8, SP142, SP263). Tal como en este último ejemplo.



Ejemplo 3. El caso resultó positivo para todas las clonas evaluadas.

Se realizó una comparativa múltiple de concordancia diagnóstica de las diferentes clonas de PD-L1, observando un perfil de positividad similar con el coeficiente Phi, siendo este moderado a bueno entre ellas. Se obtuvo una mayor concordancia entre las clonas SP263 y SP142, y la menor concordancia entre las clonas 22c3 y SP263.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la positividad de las clonas, puesto que se usó la prueba de McNemar. Ninguna prueba es inferior a otra comparativamente. Por lo que en este contexto podrían considerarse pruebas equivalentes.

Tabla 5. Concordancia de las diferentes clonas anti- PD-L1 respecto a positividad.

	SP142	SP263	28.8	22c3	grado de acuerdo de Phi
SP142		0.66 ^{a,b} ,p=0.3711	0.58 ^{a,b} , p=0.1386	0.56 ^{a,b} ,p=0.6831	< 0 sin acuerdo 0 - 0.2 insignificante 0.21 - 0.4 bajo 0.41 - 0.6 moderado 0.61 - 0.8 bueno 0.81 - 1.0 muy bueno
SP263	0.66 ^{a,b} ,p=0.3711		0.65 ^{a,b} ,p=0.6821	0.41 ^{a,b} ,p=1	
28.8	0.58 ^{a,b} ,p=0.1386	0.65 ^{a,b} ,p=0.6821		0.58 ^{a,b} ,p=0.1386	
22c3	0.56 ^{a,b} ,p=0.6831	0.41 ^{a,b} ,p=1	0.58 ^{a,b} ,p=0.1386		

^a Indica Coeficiente de Phi.. ^b Indica prueba de McNemar

Para cumplir con el objetivo secundario del estudio, se realizó un análisis exploratorio con comparaciones múltiples evaluando predictores clinicopatológicos (medida de Breslow, nivel de Clark, presencia de ulceración, presencia de invasión angiolímfática, presencia de invasión perineural, presencia de infiltrado linfocítico, datos de regresión, estadio patológico pTNM), con relación a la expresión (positividad) de las diversas clonas, sin observar diferencias estadísticamente significativas en este aspecto (Tablas 6,7,8 y 9).

Tabla 6.- Asociación entre positividad de clona 22C3 y características clinicopatológicas.

Característica clinicopatológica	Valor de <i>P</i>
Sexo	1
Edad	0.2774
Medida Breslow	0.3736
Nivel de Clark	0.2693
Presencia de ulceración	0.6591
Invasión perineural	0.8636
Invasión angiolinfática	0.6153
TILs	0.5148
Microsatélites	0.5142
Datos de regresión	0.8298
pT	0.4921
pN	0.2983
pM	0.0535

Tabla 7.- Asociación entre positividad de clona 28-8 y características clinicopatológicas.

Característica clinicopatológica	Valor de <i>P</i>
Sexo	0.4366
Edad	0.7623
Medida Breslow	0.0722
Nivel de Clark	0.9556
Presencia de ulceración	0.4416
Invasión perineural	0.7899
Invasión angiolinfática	0.4943
TILs	0.9228
Microsatélites	0.3726
Datos de regresión	0.0075
pT	0.0251
pN	0.9463
pM	0.9999

Tabla 8.- Asociación entre positividad de clona SP142 y características clinicopatológicas

Característica clinicopatológica	Valor de <i>P</i>
Sexo	0.7831
Edad	0.2795
Medida Breslow	0.826
Nivel de Clark	0.6901
Presencia de ulceración	0.4452
Invasión perineural	0.503
Invasión angiolinfática	0.2075
TILs	0.2908
Microsatélites	0.7451
Datos de regresión	0.6816
pT	0.6693
pN	0.907
pM	0.1695

Tabla 9.- Asociación entre positividad de clona SP263 y características clinicopatológicas

Característica clinicopatológica	Valor de <i>P</i>
Sexo	0.6145
Edad	0.0044
Medida Breslow	0.0303
Nivel de Clark	0.6901
Presencia de ulceración	0.6144
Invasión perineural	0.4731
Invasión angiolinfática	0.3104
TILs	0.4334
Microsatélites	0.9971
Datos de regresión	0.0059
pT	0.0251
pN	0.9135
pM	0.3104

DISCUSIÓN

El cáncer de piel corresponde a una de las neoplasias más comunes a nivel mundial, de todas las variedades el melanoma corresponde al tipo histológico más agresivo.

El melanoma presenta mayor prevalencia en población caucásica, siendo el subtipo histológico más común en ellos el Melanoma de extensión superficial el cual presenta una fuerte asociación a la exposición a la radiación ultravioleta de la luz solar. En la población mexicana, como sucede con la población asiática o afroamericana, el melanoma presenta una menor incidencia, siendo la variedad acral la predominante en ellos, la cual no presenta una relación etiológica conocida. (3,21,22).

En la actualidad, el uso de inmunoterapia con bloqueadores de la vía PD-L1 corresponde a una las piedras angulares de tratamiento, sola o en combinación con otro medicamento; presentando una mayor utilidad en enfermedad avanzada o metastásica. (14, 23).

Diversos estudios han mostrado que la positividad del marcador de inmunohistoquímica para PD-L1, puede predecir la respuesta a la inmunoterapia con bloqueadores de PD-L1, lo que permite de cierta manera seleccionar a los pacientes que se beneficiaría de esta terapia con mayor probabilidad (24,25).

En la actualidad se encuentran disponibles diferentes clonas comerciales para valorar la expresión del marcador PD-L1, las cuales son producidas por diferentes laboratorios, diseñadas para diferentes plataformas, y las cuales cuentan con diferentes métodos de puntaje. En nuestro estudio pudimos utilizar 4 clonas con las que contábamos en nuestro laboratorio, siendo estas la SP142 y SP263 de Ventana, la 28-8 de Abcam y la 22C3 de Dako.

Utilizando únicamente casos de melanoma acral primario (n=47 casos), encontramos una expresión del marcador de PD-L1 variable entre las diferentes

clonas, presentando una positividad para la clona SP142 del 15%, para la clona SP263 del 21%, para la clona 28-8 del 26% y para la clona 22C3 del 19%. De todas ellas, la que presento menor porcentaje de positividad fue la clona SP142, ya que es bien sabido que esta presenta mayor afinidad por células inmunes que por células tumorales. Estos porcentajes de positividad son menores a los reportados en la literatura, puesto que existen estudios como el de Kaunitz *et al* (15), en la que ellos encontraron una positividad para el melanoma en general independiente de la variedad del 30%, y del melanoma acral en particular del 31%; además cabe resaltar que solo se utilizó una única clona (5H1), la cual no fue valorada en nuestro estudio.

Estas diferencias de valores pueden ser explicadas a la ya bien documentada heterogeneidad de la expresión intratumoral del marcador por inmunohistoquímica en diversas neoplasias como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, e incluso melanoma (26, 27). Siendo una limitante de nuestro estudio el uso de histoarreglos en lugar de secciones histológicas completas, dejando una limitada cantidad de tejido para valorar.

Encontramos, al realizar un análisis comparativo de la concordancia diagnóstica entre las diferentes clonas, un perfil de positividad muy similar entre ellas con el coeficiente Phi, siendo este de moderado a bueno. Presentando una mayor concordancia entre las clonas SP263 y SP142, y una menor concordancia las clonas SP263 y 22C3. Utilizando la prueba de McNemar se concluyó que ninguna clona fue inferior a otra comparativamente, por lo que se podrían considerar equiparables. Estos hallazgos son similares a los encontrados en el estudio de Sunshine *et al* (19), quienes valoraron casos de melanoma sin especificar subtipo histológico, utilizando 5 clonas distintas (5H1, SP142, SP263, 28-8 y 22C3), encontrando una fuerte correlación de positividad para todas las clonas, siendo en su estudio las más concordantes las clonas SP263 y SP142, y las menos concordantes las clonas 28-8 y 5H1.

Al buscar comparar la positividad de cada una de las clonas en particular con relación a las características clínicopatológicas, incluyendo sexo, edad, medida de

Breslow, nivel de Clark, presencia de invasión perinerual, angiolinfática, microsatélites, infiltrado inflamatorio intratumoral, datos de regresión y estadio pTNM, no se encontró una relación significativa entre estos. Dichos hallazgos han sido previamente documentados en la literatura, como en el estudio de Ren *et al* (20), quienes valoraron casos de melanoma acral en población asiática, y que de manera secundaria buscaron esta asociación, sin encontrar una relación significativa; o de igual manera estudios basados en casos de melanoma sin especificar subtipo histológico han encontrado hallazgos similares (26).

Entre las limitantes del estudio, podría encontrarse el tamaño de la muestra, ya que solo fue posible valorar 47 casos; también como mencione anteriormente, otra limitante podría ser el muestreo, puesto que solo se selecciono un área representativa del tumor en cada caso en particular en lugar de secciones completas del tumor, aunado a la heterogeneidad del marcador.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que evalúa la expresión de PD-L1 en melanoma acral en población mexicana, y que además utiliza cuatro clonas distintas para su valoración (SP142, SP263, 28-8 y 22C3).

Encontramos una expresión variable del marcador de PD-L1 con los diferentes anticuerpos, mostrando una positividad la clona SP142 del 15%, para la clona SP263 del 21%, para la clona 28-8 del 26% y para la clona 22C3 del 19%.

Se observó un perfil de positividad entre clonas similar, encontrando una concordancia entre ellas de moderada a buena; siendo las clonas SP263 y SP142 las que presentaron mayor tasa de concordancia, y las clonas 22C3 y SP263 las que presentaron la menor concordancia. Por lo que en un contexto de laboratorio podrían considerarse equiparable, no siendo ninguna superior a otra comparativamente.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1, valorado con las diferentes clonas, con diferentes parámetros clinicopatológicos.

Si bien sabemos que clínicamente las diferentes clonas de PD-L1 no se intercambiables, puesto que cada una de ellas cuenta con un fármaco y estudio clínico asociado, al menos su positividad por inmunohistoquímica en melanoma acral podría considerarse equivalente. Por lo que futuros estudios son necesarios para comprobar de manera más precisa esta correlación.

REFERENCIAS

- 1.- World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: Melanoma of skin, 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>
- 2.- World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: México, 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- 3.- Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. eds. WHO Classification of Skin Tumors. *World Health Organization of Tumors, 4th ed Volume 11*. Lyon France; 2018, ISBN-13 978-92-832- 2440-2.
- 4.- Dimitriou, F. (2018) The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. *Current Oncology Reports* (2018) 20: 87 <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0732-8>
- 5.- Herrera, N. (2010) El melanoma en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 2010 ;15(3):161-164 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47316054010>.
- 6.- Pereda, C., Través, V., Requena, C., Serra-Guillén, C., Llombar, B., San Martín, O., Guillén, C. y Nagore, E. (2013). Estudio descriptivo de la presentación clínica del melanoma lentiginoso acral. *Actas Dermosifiliográficas*, 104(3),220-226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2012.06.006>
- 7.- Barrera, A., Herrera, N., Fernández, F. y Mercadillo, P. (2019). Características clínicas e histopatológicas del melanoma nodular y acral lentiginoso en pacientes mexicanos. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 17(3) Disponible en: <https://dcmq.com.mx/edici%C3%B3n-julio-septiembre-2019-volumen-17-n%C3%BAmero-3/739-caracter%C3%ADsticas-cl%C3%ADnicas-e-histopatol%C3%B3gicas-del-melanoma-nodular-y-acral-lentiginoso-en-pacientes-mexicanos.html>
- 8.- Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F., et al. (2018). PD-L1. *Journal of Clinical Pathology*, 71,189-194. doi:10.1136/jclinpath-2017-204853
- 9.- Cha, J. H., Chan, L. C., Li, C. W., Hsu, J. L., y Hung, M. C. (2019). Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Molecular cell*, 76(3), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.030>
- 10.- Han, Y., Liu, D., y Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3), 727–742.
- 11.- O'Malley, D.P., Yang, Y., Boisot, S. et al. (2019). Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. *Mod Pathol*, 32, 929–942. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0210-3>
- 12.- Paver, E. C., Cooper, W. A., Colebatch, A. J., Ferguson, P. M., Hill, S. K., Lum, T., Shin, J. S., O'Toole, S., Anderson, L., Scolyer, R. A., y Gupta, R. (2021). Programmed

death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology*, 53(2),141–156. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.10.007>

13.- Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., Chen, S., Klein, A. P., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., y Chen, L. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science translational medicine*, 4(127), 127ra37. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>

14.- Gellrich, F. F., Schmitz, M., Beissert, S., & Meier, F. (2020). Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma-An Update. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 223. <https://doi.org/10.3390/jcm9010223>

15.- Kaunitz, G. J., Cottrell, T. R., Lilo, M., Muthappan, V., Esandrio, J., Berry, S., Xu, H., Ogurtsova, A., Anders, R. A., Fischer, A. H., Kraft, S., Gerstenblith, M. R., Thompson, C. L., Honda, K., Cuda, J. D., Eberhart, C. G., Handa, J. T., Lipson, E. J., y Taube, J. M. (2017). Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 97(9), 1063–1071. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.64>

16.- Madore, J., Strbenac, D., Vilain, R., Menzies, A. M., Yang, J. Y., Thompson, J. F., Long, G. V., Mann, G. J., Scolyer, R. A., y Wilmott, J. S. (2016). PD-L1 Negative Status is Associated with Lower Mutation Burden, Differential Expression of Immune-Related Genes, and Worse Survival in Stage III Melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(15), 3915–3923. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1714>

17.- Danilova, L., Wang, H., Sunshine, J., Kaunitz, G. J., Cottrell, T. R., Xu, H., Esandrio, J., Anders, R. A., Cope, L., Pardoll, D. M., Drake, C. G., y Taube, J. M. (2016). Association of PD-1/PD-L axis expression with cytolytic activity, mutational load, and prognosis in melanoma and other solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), E7769–E7777. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607836113>

18.- Obeid, J. M., Erdag, G., Smolkin, M. E., Deacon, D. H., Patterson, J. W., Chen, L., Bullock, T. N., & Slingluff, C. L. (2016). PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome. *Oncoimmunology*, 5(11),e1235107. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1235107>

19.- Sunshine, J. C., Nguyen, P. L., Kaunitz, G. J., Cottrell, T. R., Berry, S., Esandrio, J., Xu, H., Ogurtsova, A., Bleich, K. B., Cornish, T. C., Lipson, E. J., Anders, R. A., & Taube, J. M. (2017). PD-L1 Expression in Melanoma: A Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(16), 4938–4944. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1821>

20.- Ren, M., Dai, B., Kong, Y. Y., Lv, J. J., y Cai, X. (2018). PD-L1 expression in tumour-infiltrating lymphocytes is a poor prognostic factor for primary acral melanoma patients. *Histopathology*, 73(3), 386–396. <https://doi.org/10.1111/his.13527>

- 21.- Ward, W.H., Farma, J.M. (2017), *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Codon Publication. DOI: <http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneoumelanoma.2017>
- 22.- Apalla, Z., Nashan, D., Weller, R. B., y Castellsagué, X. (2017). Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatology and therapy*, 7(Suppl 1), 5–19. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0165-y>
- 23.- Chae, Y.K., Arya, A., Iams, W. *et al.* (2018). Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. immunotherapy cancer*, 6, 39. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0349-3>
- 24.- Morrison, C., Pabla, S., Conroy, J.M. *et al.* (2018). Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden. *J. immunotherapy cancer*. 6, 32 <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0344-8>
- 25.- Khattak, M.A., Reid, A., Freeman, J., Pereira, M., McEvoy, A., *et al.* (2020). PD-L1 Expression on Circulating Tumor Cells May Be Predictive of Response to Pembrolizumab in Advanced Melanoma: Results from a Pilot Study, *The Oncologist*. 25(3), 520-527. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0557>
26. Madore, J., Vilain, R. E., Menzies, A. M., Kakavand, H., Wilmott, J. S., Hyman, J., Yearley, J. H., Kefford, R. F., Thompson, J. F., Long, G. V., Hersey, P., & Scolyer, R. A. (2015). PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment cell & melanoma research*, 28(3), 245–253. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12340>
27. Nakamura, S., Hayashi, K., Imaoka, Y., Kitamura, Y., Akazawa, Y., Tabata, K., Groen, R., Tsuchiya, T., Yamasaki, N., Nagayasu, T. y Fukuoka, J. (2017). Intratumoral heterogeneity of programmed cell death ligand-1 expression is common in lung cancer, *PLoS ONE*, 12(10): e0186192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186192>