



INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER

ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DIAGNÓSTICA DE LA IASLC

EDITADO POR

Yasushi Yatabe, MD, PhD

Alain C. Borczuk, MD

Wendy A. Cooper, MBBS, Bsc (Med), FRCPA, PhD

Sanja Dacic, MD, PhD

Keith M. Kerr, MD, FRCPATH, FRCPE

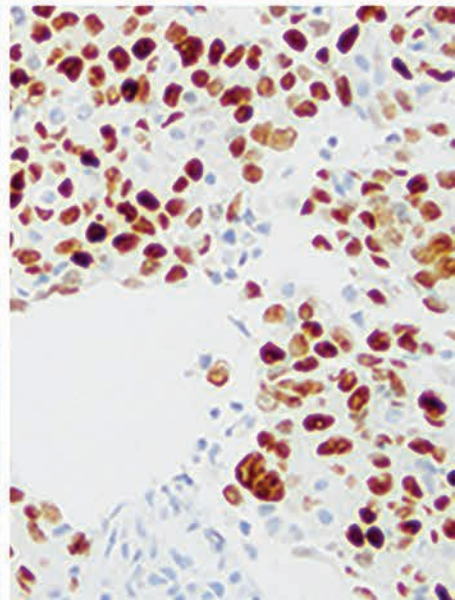
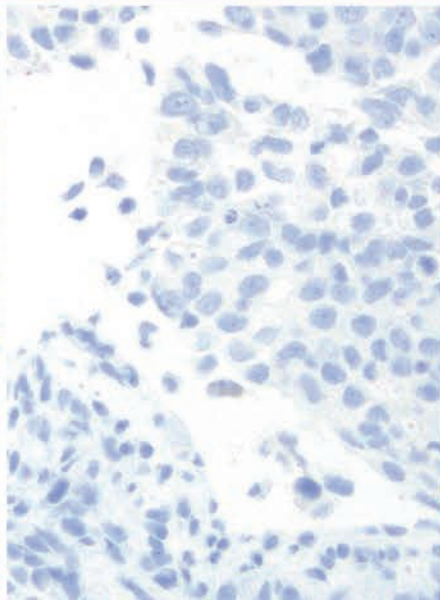
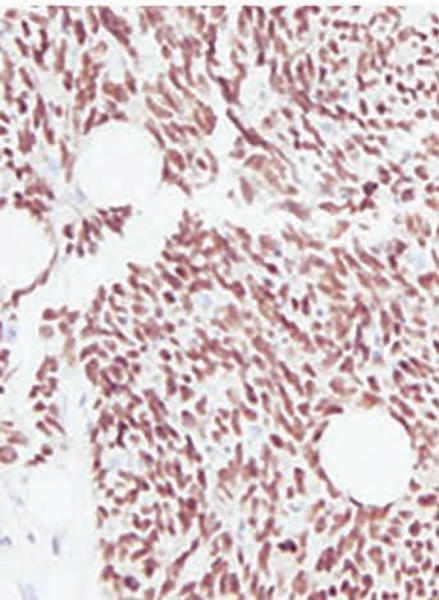
Andre L. Moreira, MD, PhD

Ming Sound Tsao, MD, FRCPC

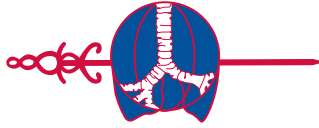
IASLC



Combatiendo los cánceres torácicos
en todo el mundo



IASLC



Combatiendo los cánceres torácicos
en todo el mundo

ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DIAGNÓSTICA DE LA IASLC

◀ Imagen anterior

Contenido

Preguntas clave

Anticuerpos

Imagen siguiente ▶

International Association for the Study of Lung Cancer, Denver, CO, EE. UU.

Editores:

Yasushi Yatabe, MD, PhD

Alain C. Borczuk, MD

Wendy A. Cooper, MBBS, Bsc (Med), FRCPA, PhD

Sanja Dacic, MD, PhD

Keith M. Kerr, Bsc, MB ChB, FRCPath, FRCPEd (hon), FRCSI (hon)

Andre L. Moreira, MD, PhD

Ming Sound Tsao, MD, FRCPC

Oficina de la IASLC:

IASLC, 999 17th Street, Suite 200, Denver, Colorado 80202, USA

www.iaslc.org

Septiembre del 2020

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ISBN: 978-1-940488-07-3

Copyright © 2020 *International Association for the Study of Lung Cancer*

Todos los derechos reservados

Sin perjuicio de los derechos de autor reservados anteriormente, queda prohibido reproducir, almacenar o ingresar cualquier parte de esta publicación en un sistema de recuperación, o transmitirla de cualquier forma o por cualquier medio, sin permiso previo por escrito.

Si bien la información contenida en este libro se considera verdadera y precisa a la fecha de su publicación, ni la IASLC ni los editores ni la editorial asumen responsabilidad legal alguna por los errores u omisiones que se podrían cometer. La editorial no ofrece garantía alguna, expresa o implícita, en relación con el material que contiene este libro.

ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DIAGNÓSTICA DE LA IASLC

EDITADO POR

YASUSHI YATABE, MD, PhD

ALAIN C. BORCZUK, MD

WENDY A. COOPER, MBBS, Bsc (Med), FRCPA, PhD

SANJA DACIC, MD, PhD

KEITH M. KERR, BSc, MB ChB, FRCPath, FRCPEd (hon), FRCSI (hon)

ANDRE L. MOREIRA, MD, PhD

MING SOUND TSAO, MD, FRCPC

UNA PUBLICACIÓN DE LA *INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER*

Agradecimientos

La *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) agradece la generosa financiación y el apoyo proporcionado por *Agilent*; *AstraZeneca*; *Bristol Myers Squibb*; *Diaceutics*, *Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania; y *Roche Tissue Diagnostics* para la elaboración del *Atlas de inmunohistoquímica diagnóstica de la IASLC*.

Los coeditores y colaboradores también agradecen la ayuda de Jillian Daigneault, PhD, directora de proyectos de asuntos científicos de la IASLC, por la coordinación del proyecto; la ayuda editorial de Terese Platten; la ayuda de Stephen Adams en materia de imágenes y composición; y el apoyo editorial de Jane Olivier, presidenta de Glacier Publishing Services, por la publicación de este texto.

Contenido

Colaboradores.....	vi
Abreviaturas	x
Resumen de preguntas clave y respuestas breves.....	xiv
1 Introducción	1
2 Relevancia clínica del diagnóstico preciso de neoplasias torácicas mediante inmunohistoquímica	3
3 Principios de la inmunohistoquímica.....	15
4 Técnicas y tecnologías en inmunohistoquímica.....	23
5 Inmunohistoquímica en muestras pequeñas	33
6 Marcadores inmunitarios en la clasificación de los principales cánceres de pulmón resecaados.....	43
7 Factor de transcripción tiroideo 1	53
8 Inmunohistoquímica para p40 y p63 en el cáncer de pulmón	61
9 Marcadores de citoqueratina.....	67
10 Marcadores neuroendocrinos.....	75
11 Marcadores de proliferación	85
12 Inmunohistoquímica en citología	91
13 Marcadores inmunitarios para las variantes del adenocarcinoma de pulmón	103
14 Marcadores inmunitarios para otros tumores poco comunes.....	113
15 Marcadores inmunitarios para el sarcoma torácico.....	125
16 Marcadores inmunitarios para la diferenciación de tumores metastásicos	143
17 Mesotelioma e inmunohistoquímica	157
18 Tumores tímicos e inmunohistoquímica.....	167
19 Uso de la inmunohistoquímica en las pruebas de biomarcadores predictivos.....	175
20 Perspectiva final.....	189
Apéndice A: lista de anticuerpos	193
Apéndice B: fabricantes.....	199

Colaboradores

Editores



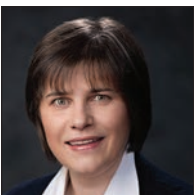
Yasushi Yatabe, MD, PhD
Editor en jefe
Departamento de Patología Diagnóstica
National Cancer Center
Tokio, Japón



Alain C. Borczuk, MD
Vicepresidente de anatomía patológica
Director de anatomía patológica
Jefe de patología torácica
Departamento de Patología
Weill Cornell Medicine
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos



Wendy A. Cooper, MBBS, Bsc (Med), FRCPA, PhD
Catedrática asociada
Patología tisular y diagnóstico oncológico
NSW Health Pathology
Royal Prince Alfred Hospital
Sídney, Nueva Gales del Sur, Australia



Sanja Dacic, MD, PhD
Catedrática
Departamento de Patología
University of Pittsburgh Medical Center
Pittsburgh, Pensilvania, Estados Unidos



Keith M. Kerr, BSc, MB ChB, FRCPath, FRCPEd (hon), FRCSI (hon)
 Patólogo asesor
 Departamento de Patología
Aberdeen Royal Infirmary
 Catedrático de patología pulmonar
 Facultad de Medicina de *Aberdeen University*
 Aberdeen, Escocia, Reino Unido



Andre L. Moreira, MD, PhD
 Catedrático de patología
 Director del *Center of Biospecimen Research and Development (CBRD)*
 Director de patología quirúrgica y patología cardiotorácica
New York University Langone Health
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos



Ming Sound Tsao, MD, FRCPC
 Patólogo, científico senior y catedrático
 Titular de la cátedra M. Qasim Choksi en investigación traslacional
 del cáncer de pulmón
Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network
 Departamento de Medicina de Laboratorio y Patobiología
University of Toronto
 Toronto, Ontario, Canadá

Autores

Mary Beth Beasley, MD
 Catedrática de patología
 Facultad Icahn de Medicina de *Mount Sinai*
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

Sabina Berezowska, MD
 Catedrática asociada
 Instituto de Patología
Lausanne University Hospital y
Lausanne University
 Lausana, Suiza

Lukas Bubendorf, MD
 Catedrático y jefe de citopatología
 Instituto de Genética Médica y Patología
University Hospital Basel
 Basilea, Suiza

Teh-Ying Chou, MD, PhD, MBA
 Catedrático y director
 Departamento de Patología y Medicina de
 Laboratorio
Taipei Veterans General Hospital
 Taipéi, Taiwán

Jin-Haeng Chung, MD, PhD
 Catedrática
 Departamento de Patología y Medicina
 Traslacional
Seoul National University Bundang Hospital
 Seúl, Corea del Sur

Balazs Halmos, MD
 Jefe de Sección de Oncología Torácica/Cabeza
 y Cuello
 Director de *Clinical Cancer Genomics*
 Catedrático de medicina clínica/*Albert Einstein*
College of Medicine
 Bronx, Nueva York, Estados Unidos

Yuchen Han
 Catedrática
 Departamento de Patología
 Shanghai Chest Hospital
 Shanghái, China

Fred Hirsch, MD, PhD

Director ejecutivo
 Centro de Oncología Torácica
Mount Sinai Cancer Center, Mount Sinai Health System
 Catedrático de medicina
 Facultad Icahn de Medicina
 Cátedra de medicina Joe Lowe y Louis Price
 Director asociado
 Tisch Cancer Institute
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

David M. Hwang, BSc, MD, PhD, FRCPC

Jefe del Departamento de Medicina de Laboratorio y Diagnóstico Molecular
 Sunnybrook Health Sciences Centre
 Catedrático del Departamento de Medicina de Laboratorio y Patología
University of Toronto
 Toronto, Ontario, Canadá

Deepali Jain, MD, FIAC

Catedrática adicional
 Departamento de Patología
 All India Institute of Medical Sciences
 Nueva Delhi, India

Philippe Joubert, MD, PhD

Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Quebec
Universite Laval
 Ciudad de Quebec, Quebec, Canadá

Sylvie Lantuejoul, MD, PhD

Departamento de Biopatología
 Research Pathology Platform CRCL
Centre de Lutte Contre le Cancer UNICANCER Leon Berard
Universite Grenoble Alpes
 Grenoble, Francia

Fernando Lopez-Rios, MD, PhD, FIAC

Catedrático de patología y patología molecular
 Laboratorio de Terapias Dirigidas a la Patología
 HM Hospitales
 Universidad CEU San Pablo
 Madrid, España

Daisuke Matsubara, MD, PhD

Departamento de Patología
 División de Patología Integrativa
Jichi Medical University
 Shimotsuke, Tochigi, Japón

Yuko Minami, MD, PhD

Directora del Departamento de Patología
National Hospital Organization Ibaraki Higashi Hospital
The Center of Chest Diseases and Severe Motor and Intellectual Disease
 Ibaraki, Japón

Mari Mino-Kenudson, MD

Catedrática de patología
 Facultad de Medicina de Harvard
Massachusetts General Hospital
 Boston, Massachusetts, Estados Unidos

Andrew G. Nicholson, DM, FRC (Pat)

Asesor histopatólogo
Royal Brompton and Harefield Hospitals NHS Foundation Trust
 Catedrático honorario de patología respiratoria,
National Heart and Lung Division
Imperial College
 Londres, Reino Unido

Masayuki Noguchi, MD

Catedrático de patología pulmonar
 Facultad de Medicina
University of Tsukuba
 Tsukuba, Japón

Mauro Papotti, MD

Catedrático de patología
 Departamento de Oncología
University of Turin
 Torino, Italia

Harvey I. Pass, MD

Catedrático de oncología torácica para el fondo
 Stephen E. Banner
 Director de la División de Cirugía General Torácica
 Vicepresidente de investigación y cirugía cardiororácica
NYU Langone Health
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

Claudia Poleri, MD

Oficina de Asesores en Patología
 Buenos Aires, Argentina

Anja C. Roden, MD

Catedrática de medicina de laboratorio y patología
 Asesora
 Departamento de Medicina de Laboratorio y Patología
 Clínica Mayo
 Rochester, Minnesota, Estados Unidos

Prudence A. Russell, MBBS (Hon), FRCPA
Catedrática asociada
St. Vincent's Hospital y University of Melbourne
Melbourne, Victoria, Australia

Kurt A. Schalper, MD, PhD
Departamento de Patología
Facultad de Medicina de Yale
New Haven, Connecticut, Estados Unidos

Lynette M. Sholl, MD
Departamento de Patología
Brigham and Women's Hospital y Facultad de
Medicina de Harvard
Boston, Massachusetts, Estados Unidos

Erik Thunnissen, MD, PhD
Amsterdam University Medical Center VUmc
Ámsterdam, Países Bajos

William Travis, MD
Patólogo torácico asistente
Departamento de Patología
Memorial Sloan Kettering Cancer Center
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

Ignacio I. Wistuba, MD
Catedrático y director
Departamento de Patología Molecular Traslacional
The University of Texas MD Anderson
Cancer Center
Houston, Texas, Estados Unidos

Akihiko Yoshida, MD, PhD
Departamento de Patología Diagnóstica
National Cancer Center Hospital
Tokio, Japón

Abreviaturas

En el texto se utilizan las siguientes abreviaturas:

3-D: tridimensional
ABC: complejo avidina-biotina
ADC: adenocarcinoma
AEC: 3-amino-9-etilcarbazol
AFP: α -fetoproteína
ALK: quinasa del linfoma anaplásico
AMI: adenocarcinoma mucinoso invasivo
AMP: *Association for Molecular Pathology*
ARNm: ARN mensajero
AUC: área bajo la curva
 β -HCG: gonadotropina coriónica humana beta
BALT: tejido linfoide asociado al bronquio
BAP1: proteína 1 asociada a BRCA1
BET: bromodominio y extraterminal
BPQ: biopsia pulmonar quirúrgica
BRAF: protooncogén B-raf
BRD: proteína que contiene el dominio bromodominio y extraterminal (BET)
CA: carcinoide atípico
CA IX: anhidrasa carbónica IX
CAMTA1: activador 1 de la transcripción de unión a calmodulina
CAP: *College of American Pathologists*
CCE: carcinoma de células escamosas
CCR: cáncer colorrectal
CDK4: quinasa 4 dependiente de ciclina
CE: *Conformité Européenne*
CEA: antígeno carcinoembrionario
CK5/6: citoqueratina 5/6
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CM: carcinoma microcítico
CMPT: tumor papilar muconodular ciliado
CMV: citomegalovirus
CNECG: carcinoma neuroendocrino de células grandes
CNM: carcinoma no microcítico

CPM: carcinoma de pulmón microcítico
 CPNM: carcinoma de pulmón no microcítico
 CSA-II: amplificación catalizada de señal
 CSA: amplificación catalizada de señal
 ctDNA: ADN tumoral circulante
 DAB: 3,3'-diaminobencidina
 DAPI: 4',6'-diamidino-2-fenilindol
 EBUS-FNA: aspiración transbronquial con aguja fina guiada por endosonografía
 ECT2: transformante 2 de células epiteliales
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
 EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
 EHE: hemangioendotelioma epitelioide
 ELISA: análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
 EMA: antígeno de membrana epitelial
 EQA: evaluación de calidad externa
 ER: receptor de estrógeno
 ETV4: factor de transcripción 4 de la variante ETS
 EZH2: potenciador del homólogo zeste 2
 FA: fosfatasa ácida [o alcalina]
 FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
 FFPE: fijado en formalina y embebido en parafina
 FISH: hibridación fluorescente *in situ*
 FNA: aspiración con aguja fija
 FOB: broncoscopia flexible de fibra óptica
 GCDFP: proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica
 GFAP: proteína ácida fibrilar glial
 GI: gastrointestinal
 H&E: hematoxilina y eosina
 hASH1: homólogo 1 de Achaete-scute humano
 HB_s: antígeno de superficie de la hepatitis B
 HCC: carcinoma hepatocelular
 HepPar1: parafina de hepatocitos 1
 HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
 HIAR: recuperación de antígenos inducida por calor
 HiDAC: citarabina en dosis altas
 HMW: alto peso molecular
 HNF4 α : factor nuclear 4 alfa de hepatocitos
 HQ: 3-hidroxi-2-quinoxalina
 HRP: peroxidasa de rábano
 IC: inmunocito
 ICAPC: controles críticos de rendimiento de prueba inmunohistoquímica
 IFN- γ : interferón gamma
 IHQ: inmunohistoquímica
 IL-8: interleucina-8
 INI1: inhibidor de integrasa 1
 INSM1: proteína 1 asociada al insulinoma
 irPRC: criterios de respuesta patológica relacionada con la inmunidad
 ISH: hibridación *in situ*

IVD: diagnóstico(s) *in vitro*
KRAS: homólogo oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten
LAG-3: gen de activación de linfocitos 3
LCA: antígeno leucocitario común
LDT: prueba desarrollada en laboratorio
LMW: bajo peso molecular
LSAB: estreptavidina-biotina marcada
MDM2: homólogo de ratón doble minuto 2/proteína ubiquitina-ligasa E3
MEK: quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)
MET: protooncogén MET
MIBI: ionización basada en haces de iones múltiples
MiTF: factor de transcripción asociado con microftalmia
MPM: mesotelioma pleural maligno
MPNST: tumor maligno de la vaina del nervio periférico
MPR: respuesta patológica mayor
MSA: actina específica de músculo
MSI: inestabilidad microsatelital
MTAP: metiltioadenosina fosforilasa
MYB: protooncogén de la mieloblastosis, factor de transcripción
NCAM1: molécula de adhesión celular neural 1
NE: neuroendocrino
NEC: carcinoma neuroendocrino
NEN: neoplasias neuroendocrinas
NGS: secuenciación de nueva generación
NKX3.1: gen NK3 homeobox 1
NOS: no especificado
NRG1: neuregulina
NSE: enolasa específica de neurona
NTRK: gen receptor de tirosina quinasa neurotrófica
NUT: proteínas nucleares en testículo
OMS: Organización Mundial de la Salud
OTP: proteína homeobox orthopedia
PI3KCA: subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa
PAS: ácido peryódico de Schiff
PBMC: células mononucleares de sangre periférica
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PD-1: proteína 1 de muerte celular programada
PD-L1: ligando 1 de muerte programada
PEComa: tumor de células epitelioides perivasculares
PMA: forbol miristato acetato
PR: receptor de progesterona
PSA: antígeno prostático específico
PSAP: fosfatasa ácida específica de la próstata
PSMA: antígeno de membrana específico de la próstata
RB: retinoblastoma
RET: protooncogén RET
ROC: característica operativa del receptor

ROS1: oncogén c-ros 1
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SALL4: Factor de transcripción tipo Spalt 4 (o proteína tipo Sal 4)
SMA: actina del músculo liso
SP-A, SP-B: proteína surfactante A, proteína surfactante B
STAS: diseminación tumoral a través de espacios alveolares
STAT6: transductor de señal y activador de la transcripción 6
SUVmax: valor de captación estándar máximo
TBBx: biopsia transbronquial
TBNA: aspiración transbronquial con aguja
TC: carcinoide típico
TC: tomografía computarizada
TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal
TEP: tomografía por emisión de positrones
TFE3: factor de transcripción E3
TFS: tumor fibroso solitario
TIM-3: proteína 3 que contiene dominio de mucina
TKI: inhibidor de la tirosina quinasa
TLE1: proteína 1 potenciadora similar a la transducina
TMB: carga mutacional tumoral
TMI: tumor miofibroblástico inflamatorio
TNBC: carcinoma de mama triple negativo
TPS: puntuación de proporción tumoral
TTF1: factor de transcripción tiroideo 1
UIP: neumonía intersticial usual
UK NEQAS: *U.K. National External Quality Assessment Service*
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
VPH: virus del papiloma humano
WT1: proteína del tumor de Wilms
WT: tipo salvaje
ZEB1: proteína homeobox 1 de unión a E-box de dedo de zinc

Resumen de preguntas clave y respuestas breves

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
Capítulo 5		
Inmunohistoquímica en muestras pequeñas	5.1 ;Se debe realizar inmunohistoquímica (IHQ) en todas las biopsias pequeñas?	La impresión morfológica del patólogo debe guiar el enfoque diagnóstico inicial: si la biopsia muestra una diferenciación morfológica clara de un carcinoma de células escamosas (es decir, queratinización) o de un adenocarcinoma (es decir, formación glandular), se aconseja al patólogo emitir el diagnóstico correspondiente, y no es obligatorio aplicar la IHQ que lo confirma.
	5.2 ;Cuándo se debe realizar la IHQ para clasificar el carcinoma no microcítico (CNM)?	La IHQ se debe realizar en el carcinoma poco diferenciado (a menudo con un patrón de crecimiento sólido).
	5.3 ;Cuáles son los mejores marcadores iniciales para clasificar el CNM?	La combinación de p40 y el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) tiene la mejor sensibilidad y especificidad para separar el CNM en adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas.
	5.4 ;Qué otros marcadores tumorales pueden ser útiles en la clasificación del CNM?	La napsina A y la citoqueratina 5/6 (CK5/6) pueden mejorar la clasificación en algunos CNM no especificados (NOS). Se debe añadir una panqueratina en caso de un tumor poco diferenciado que sea negativo para TTF1, p40, CK5/6 y napsina A.
	5.5 ;Cuáles son los mejores marcadores para las neoplasias neuroendocrinas (NE)?	Para confirmar el fenotipo de las NE, se debe añadir un panel de marcadores de NE (cromogranina, sinaptofisina, CD56 y/o proteína 1 asociada a insulina (INSM1)). Además, un marcador de proliferación es útil en biopsias pequeñas con un artefacto de aplastamiento significativo.
	5.6 ;Cuáles son los escenarios de diagnóstico difíciles en las biopsias pequeñas?	Los artefactos asociados a las biopsias pequeñas, como la mala preservación celular, el artefacto de aplastamiento y la distorsión, son propensos a confundir la interpretación de las estructuras benignas y a enmascarar las características morfológicas de las células tumorales. Es necesario correlacionar cuidadosamente la histología y las tinciones inmunohistoquímicas.
	5.7 ;Cómo se deben manejar las muestras de biopsia para optimizar los resultados de las pruebas de biomarcadores predictivos?	Se debe establecer un protocolo detallado de utilización de los tejidos en cada laboratorio para la determinación de los marcadores predictivos.
Capítulo 6		
Marcadores inmunitarios en la clasificación de los cánceres de pulmón graves resecaados	6.1 ;Cuál es la mejor combinación de marcadores por utilizar en la práctica cotidiana para diferenciar el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas?	En la práctica cotidiana, el TTF1 y el p40 serán suficientes para subtipificar la mayoría de los CNM sin definir las características morfológicas o la morfología NE. Este panel se puede ampliar cuando se sospechen metástasis o variantes poco comunes.
	6.2 ;Cuál es la función de los marcadores inmunitarios en el diagnóstico del carcinoma adenoescamoso?	La IHQ para el TTF1 y el p40 pueden ser útiles en el diagnóstico del carcinoma adenoescamoso cuando resaltan dos poblaciones celulares tumorales distintas.

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
	6.3 ¿Cuál es la utilidad de la IHQ en el carcinoma sarcomatoide?	La inmunorreactividad para la citoqueratina puede ser útil para confirmar un patrón fusiforme maligno o de carcinoma de células gigantes en el carcinoma pleomórfico. La IHQ en subtipos poco comunes puede confirmar elementos heterólogos, o un componente de adenocarcinoma fetal en un blastoma.
	6.4 ¿Cuál es la función de la IHQ en el diagnóstico del carcinoma de células grandes?	En los carcinomas no diferenciados negativos a la mucicarmina, sin tinción para TTF1, napsina A o p40, se puede hacer un diagnóstico de carcinoma de células grandes, tras considerar el carcinoma deficiente de <i>SMARCA4</i> .
Capítulo 7		
Factor de transcripción tiroideo 1	7.1 ¿Existen diferencias de tinción en el adenocarcinoma de pulmón entre los clones de TTF1?	El desempeño de tinción del TTF1 varía entre los clones. Entre los anticuerpos más utilizados, el 8G7G3/1 es el más específico para identificar el adenocarcinoma de pulmón.
	7.2 ¿Qué grado de tinción del TTF1 se considera un resultado positivo?	La positividad focal para TTF1 se considera una reacción positiva que indica adenocarcinoma pulmonar en el contexto clínico adecuado, y los valores de corte óptimos varían entre los clones.
	7.3 ¿Existen consideraciones preanalíticas para la inmunotinción de TTF1?	Existen algunas consideraciones preanalíticas específicas en relación con la inmunotinción de TTF1, sobre todo en relación con la reducción o ausencia de tinción en muestras preparadas con fijadores a base de alcohol y sometidos a ciertos agentes descalcificadores.
Capítulo 8		
Inmunohistoquímica para el p40 y p63 en el cáncer de pulmón	8.1 ¿En qué casos se debe utilizar el p40 en lugar del p63?	El p40 se debe utilizar para la identificación de carcinomas de células escamosas morfológicamente no diferenciados, ya que demuestra una precisión superior a la del p63 en este contexto.
	8.2 ¿En qué casos se debe utilizar el p63 en lugar del p40?	Si en el diagnóstico diferencial de un tumor se tiene en cuenta el carcinoma de proteínas nucleares en testículo (NUT), el p63 podría ser más útil que el p40.
	8.3 ¿Qué grado de reacciones positivas del p40/p63 se debe considerar positivo?	Suele haber una fuerte positividad difusa para el p40 (y el p63) en los carcinomas de células escamosas, y la expresión en al menos el 50 % de los núcleos se debe considerar como un resultado positivo.
Capítulo 9		
Marcadores de citoqueratina	9.1 ¿Qué son las tinciones de pancitoqueratina y cuál es su función en el diagnóstico del cáncer de pulmón?	Las tinciones de pancitoqueratina permiten establecer el diagnóstico de carcinoma cuando el tumor es morfológicamente no diferenciado.
	9.2 ¿Los marcadores CK5 o CK5/6 son sensibles y específicos para el carcinoma de células escamosas de pulmón?	El CK5/6 no tiene una sensibilidad y especificidad adecuadas, por lo que no se debe utilizar solo para diagnosticar el carcinoma de células escamosas de pulmón.
	9.3 ¿Se debe utilizar el CK7 para diferenciar el adenocarcinoma de pulmón del carcinoma de células escamosas?	El CK7 no se debe utilizar para diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del carcinoma de células escamosas.
	9.4 ¿Se debería considerar como "probable adenocarcinoma" un CNM, el cual es difusamente positivo para CK7 pero negativo para TTF1 y p40?	El CK7 por sí solo es insuficiente para establecer un diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar.
	9.5 ¿El CK7 es una tinción útil para diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del mesotelioma?	El CK7 no permite diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del mesotelioma maligno.
	9.6 ¿Qué anticuerpo de citoqueratina es preferible para teñir el carcinoma de pulmón microcítico (CPM)?	Se prefieren los anticuerpos de pancitoqueratina cuando se utilizan para reconocer el CPM.
	9.7 ¿Cuál es la utilidad del CK20 en el diagnóstico del cáncer de pulmón?	La positividad del CK20 no excluye el adenocarcinoma mucinoso de origen pulmonar.
	9.8 ¿Qué anticuerpo de citoqueratina se debe utilizar en el caso del mesotelioma?	La pancitoqueratina y el CK5/6 son útiles en el diagnóstico del mesotelioma, junto con otros marcadores del mesotelioma.
	9.9 ¿Cuál es la función de las citoqueratinas en el diagnóstico del timoma?	Las pancitoqueratinas son muy útiles en el diagnóstico diferencial de los timomas con respecto a otras lesiones mediastinales.

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
Capítulo 10		
Marcadores neuroendocrinos	10.1 ¿Qué marcadores de IHQ son útiles para apoyar la morfología NE en la clasificación de las neoplasias NE?	La cromogranina, la sinaptofisina, el CD56 y el INSM1 son marcadores NE útiles para apoyar la morfología NE.
	10.2 ¿Qué marcadores no NE pueden ayudar en la clasificación de los tumores durante el diagnóstico diferencial de las neoplasias neuroendocrinas (NEN)?	La panqueratina y las queratinas de bajo peso molecular, más que las queratinas de alto peso molecular, deben ser positivas en las NEN.
	10.3 ¿Cuándo se deben aplicar los marcadores NE a un CNM?	Los marcadores NE solo se deben utilizar cuando estén presentes las características morfológicas de la diferenciación NE. En muestras pequeñas en las que la morfología NE es difícil de evaluar, podría haber una mayor especificidad cuando 2 o más marcadores son positivos.
Capítulo 11		
Marcadores de proliferación	11.1 ¿Cuándo se debe utilizar un marcador de proliferación en el diagnóstico?	Un marcador de proliferación, como el Ki-67, puede ser útil en pequeñas biopsias trituradas o muestras de citología para ayudar a diferenciar los tumores carcinoides de los carcinomas NE de alto grado, ya que las células trituradas mal conservadas pueden simular tumores de alto grado. Los marcadores de proliferación no son necesarios en la evaluación diagnóstica rutinaria de los tumores NE torácicos primarios o de cualquier otro tumor torácico.
	11.2 ¿Cuál es la función del Ki-67 en la diferenciación de los tumores carcinoides típicos y atípicos?	Actualmente no se ha establecido la función de la evaluación rutinaria del Ki-67 para diferenciar los tumores carcinoides típicos y atípicos.
	11.3 ¿Qué nivel de concordancia existe entre el índice de proliferación en las muestras de biopsia y las muestras quirúrgicas?	La concordancia del índice de proliferación del Ki-67 entre las muestras de biopsia pequeñas y las muestras de resección no ha sido bien caracterizada.
	11.4 ¿Cuál es la función pronóstica del Ki-67 en los CNM?	No hay una función clínica establecida para la evaluación del Ki-67 como marcador pronóstico en los CNM.
	11.5 ¿Es importante el anticuerpo inmunohistoquímico del Ki-67?	El clon MIB1 es el anticuerpo más utilizado para evaluar el Ki-67, aunque hay pocos datos de la comparación de diferentes clones en los tumores torácicos.
	11.6 ¿Cómo se evalúa el Ki-67?	No hay un enfoque estandarizado establecido para evaluar el Ki-67 en los tumores torácicos.
Capítulo 12		
Inmunohistoquímica en citología	12.1 ¿Qué parte de la muestra citológica es mejor para la inmunotinción: el bloque celular, los frotis secados al aire o fijados en etanol?	Todas las preparaciones citológicas, incluidos los bloques celulares y los portaobjetos fijados en etanol y secados al aire, se pueden utilizar principalmente para la inmunotinción. Los bloques celulares fijados con formalina son los más sencillos y los más utilizados. Se requiere una rigurosa optimización del protocolo, validación y control de calidad en la inmunotinción de muestras citológicas, especialmente en las preparaciones sin bloque celular.
	12.2 ¿Qué grado de fiabilidad tienen las pruebas de biomarcadores inmunohistoquímicos predictivos en las muestras citológicas de cáncer de pulmón?	Las muestras citológicas se pueden utilizar para la IHQ predictiva del ligando 1 de muerte programada (PD-L1), la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) y el oncogén c-ros 1 (ROS1), y los bloques celulares son actualmente las preparaciones recomendadas. Los datos limitados sobre estas IHQ predictivas en portaobjetos sin bloque celular son prometedores, pero necesitan más confirmación.
Capítulo 13		
Marcadores inmunitarios para las variantes del adenocarcinoma de pulmón	13.1 ¿Cuál es el perfil inmunológico del adenocarcinoma mucinoso invasivo (AMI)?	El AMI suele expresar marcadores de diferenciación intestinal, como el CDX2 y el factor nuclear 4 alfa de hepatocitos (HNF4a), junto con el CK7, mientras que la expresión de TTF1 y napsina A es limitada.
	13.2 ¿Son útiles las inmunotinciones en el diagnóstico del AMI?	La IHQ puede ser útil para diferenciar la AMI de entidades no malignas y del adenocarcinoma de pulmón no AMI, aunque la diferenciación entre AMI y la metástasis de un tumor primario extrapulmonar, en particular, un tumor primario del tracto gastrointestinal (GI) superior o pancreatobiliar, puede ser extremadamente difícil.

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
	13.3 ¿Cuál es el perfil inmunológico del adenocarcinoma coloide de pulmón?	Un panel de IHQ (CK7, CK20, TTF1, napsina A, CDX2 y otros marcadores específicos de sitios diferentes al pulmón) puede ser útil para diferenciar el adenocarcinoma coloide de pulmón del adenocarcinoma mucinoso metastásico de un sitio diferente al pulmón.
	13.4 ¿Cuál es el mejor panel de IHQ para diferenciar el adenocarcinoma entérico de pulmón del adenocarcinoma colorrectal metastásico?	Un panel de IHQ (incluyendo CK7 y SATB2) puede ayudar a diferenciar el adenocarcinoma entérico pulmonar del adenocarcinoma colorrectal metastásico.
	13.5 ¿Cuáles son los perfiles inmunológicos de los adenocarcinomas fetales de pulmón de bajo y alto grado?	El adenocarcinoma fetal de bajo grado se caracteriza por la localización nuclear aberrante de β -catenina, típicamente en las mórulas, mientras que el adenocarcinoma fetal de alto grado suele expresar proteínas oncofetales: α -fetoproteína, glicano 3 y/o proteína tipo Sal 4 (SALL4). Además, puede ser necesario un panel de IHQ, incluyendo TTF1 y PAX8, para diferenciar el adenocarcinoma fetal de pulmón del adenocarcinoma endometrial metastásico.
Capítulo 14		
Marcadores inmunitarios para otros tumores poco comunes	14.1 ¿La IHQ puede ayudar a diagnosticar el adenoma alveolar?	Aunque se trata principalmente de un diagnóstico con hematoxilina y eosina (H&E), la IHQ puede ser valiosa para resaltar los neumocitos neoplásicos y el estroma mesenquimal.
	14.2 ¿La IHQ del p40 tiene una función en el diagnóstico del tumor papilar muconodular ciliado (CMPT) que lo diferencia del adenocarcinoma?	Los marcadores de células basales, como el p40, el p63 y el CK5/6, ayudan a identificar la doble capa celular epitelial en el CMPT.
	14.3 ¿Cuál es el perfil inmunológico de los carcinomas NUT?	Además de la expresión del NUT, a menudo se expresan queratinas y marcadores de células basales, pero también se pueden encontrar TTF1 y el antígeno de membrana epitelial (EMA).
	14.4 ¿Cuál es el patrón de expresión del NUT en los carcinomas NUT?	Un patrón nuclear punteado en más del 50 % de las células tumorales es característico y diagnóstico del carcinoma NUT. La inmunotinción del NUT es sensible (87 %) y específica (100 % tras la exclusión del seminoma).
	14.5 ¿Son útiles los marcadores inmunitarios para diferenciar el neumocitoma esclerosante del adenocarcinoma?	Las inmunotinciones pueden ayudar en el diagnóstico del neumocitoma esclerosante, al facilitar la identificación de los 2 compartimentos celulares con diferentes perfiles inmunológicos; las queratinas y el TTF1 son elementos clave en esta distinción.
	14.6 ¿Son útiles los marcadores inmunitarios en el diagnóstico de los carcinomas mucoepidermoides pulmonares?	Con una utilidad limitada, la IHQ para el p63, el p40 o el CK5/6 podría resaltar el componente celular epidermoide.
	14.7 ¿Las inmunotinciones pueden ayudar a diagnosticar los carcinomas adenoides quísticos pulmonares y a diferenciarlos del carcinoma no microcítico y del carcinoma microcítico?	Como en el caso del carcinoma mucoepidermoide, el diagnóstico del carcinoma adenoides quístico se basa normalmente en la tinción de H&E. Sin embargo, la IHQ puede ayudar a identificar la población celular dual, especialmente en muestras morfológicamente difíciles, cuando el CD117 puede resaltar las células ductales/luminales, mientras que el p63 y el S100 tiñen las células mioepiteliales/periféricas.
	14.8 ¿Las inmunotinciones pueden ayudar a diagnosticar el carcinoma epitelial-mioepitelial de pulmón?	Al igual que con otros tumores de tipo salival, la IHQ solo ayuda a identificar las diferentes poblaciones celulares que definen las lesiones en el contexto morfológico correcto de la sección teñida con H&E.
Capítulo 15		
Marcadores inmunitarios para el sarcoma torácico	15.1 ¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles en el diagnóstico del llamado tumor maligno torácico con deficiencia de SMARCA4?	El tumor maligno torácico con deficiencia de <i>SMARCA4</i> no diferenciado muestra una ausencia o disminución marcada de la inmunotinción para <i>SMARCA4</i> (BRG1).
	15.2 ¿Cuándo se debe considerar la tinción para SMARCA4 en la evaluación de los tumores torácicos?	La tinción para <i>SMARCA4</i> se debe realizar en tumores morfológicamente no diferenciados, relativamente monótonos, discohesivos o con patrón rabdoide, y no de forma más general en carcinomas morfológicamente no diferenciados.
	15.3 ¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para demostrar la diferenciación endotelial vascular?	El ERG y el CD31 son marcadores endoteliales útiles. Otros marcadores, como el CD34 y el FLI1, son potencialmente útiles pero menos definitivos.

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
	15.4 ¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles en la subtipificación de los tumores endoteliales vasculares malignos?	La IHQ para el activador 1 de la transcripción de unión a calmodulina (CAMTA1) y el factor de transcripción E3 (TFE3) es un sustituto de la translocación y puede ser útil en la subclasificación de los tumores vasculares.
	15.5 ¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para diferenciar el sarcoma sinovial de sus imitaciones?	La IHQ para la citoqueratina y la proteína 1 potenciadora similar a la transducina (TLE1), con negativos relevantes, puede ser útil en el diagnóstico del sarcoma sinovial. Sin embargo, los casos difíciles se pueden confirmar con hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) o pruebas moleculares.
	15.6 ¿Qué marcadores inmunitarios son útiles para evaluar los tumores fibrosos solitarios (TFS)?	El transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6), mediante un anticuerpo monoclonal, es un marcador sensible y relativamente específico para los SFT.
	15.7 ¿Son útiles los marcadores inmunitarios para diagnosticar los tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI)?	En el entorno morfológico correcto, la IHQ para ALK o ROS1 puede ser útil en el diagnóstico de TMI.
	15.8 ¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para evaluar los sarcomas pleomórficos de células fusiformes?	Hay diversos marcadores que pueden ayudar a clasificar el sarcoma de células fusiformes como el MDM2, los marcadores musculares y el H3K27me3, pero todos ellos pueden tener reactividad en más de un tipo de tumor.
	15.9 ¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para evaluar el sarcoma de células redondas?	Los marcadores del sarcoma de células redondas pueden ser útiles para el diagnóstico, pero existe cierta superposición con entidades más comunes como el carcinoma microcítico. Las consideraciones epidemiológicas (la edad) y la localización del tumor pueden ser útiles, así como el FISH y las pruebas moleculares, según sea necesario.
	15.10 ¿Cuáles marcadores inmunitarios ayudan a diferenciar el tumor de células epitelioideas perivasculares (PEComa) de sus imitaciones?	Los PEComas suelen ser negativos para la citoqueratina y positivos para el HMB45, el melan A y la tirosinasa A.
Capítulo 16		
Marcadores inmunitarios para la diferenciación de tumores metastásicos	16.1 ¿La IHQ es útil para diferenciar el carcinoma de células escamosas metastásico del carcinoma de células escamosas primario de pulmón?	No existe ningún marcador de IHQ que pueda ayudar de forma fiable a diferenciar el carcinoma de células escamosas de pulmón metastásico del primario. Se requiere una correlación clinicopatológica.
	16.2 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los tumores metastásicos de origen GI de los tumores primarios de pulmón?	Una combinación de IHQ para citoqueratinas (CK7/CK20), marcadores de pulmón (TTF1/napsina A) y del tracto GI (CDX2) es útil para confirmar una metástasis de origen en el tracto GI. En los tumores TTF1/napsina A negativos, la positividad para CDX2 sugiere una metástasis del tracto GI. En los tumores TTF1/napsina A/CDX2 negativos, el perfil CK7/CK20 puede ser útil, pero normalmente se requiere una correlación clínica y radiológica para confirmar el origen.
	16.3 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen mamario del carcinoma pulmonar primario?	En cualquier paciente con antecedentes de carcinoma de mama se recomienda la comparación con las características histológicas del tumor de mama primario, siempre que sea posible. En la mayoría de los casos, una combinación de marcadores pulmonares y mamarios que incluya TTF1 y/o napsina A y receptor de estrógeno/receptor de progesterona (ER/PR) o GATA3 puede proporcionar una respuesta definitiva. Cuando sea clínicamente relevante, el GATA3 se debe combinar con la mamaglobina para descartar una neoplasia maligna extramamaria como el carcinoma de vejiga. En el carcinoma de mama triple negativo (TNBC) se recomienda una combinación de marcadores pulmonares con GATA3 y SOX10 para diferenciar el carcinoma de mama metastásico del carcinoma pulmonar primario.
	16.4 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico originado en el tracto genital femenino del carcinoma pulmonar primario?	Cuando el diagnóstico diferencial de un tumor de pulmón incluye un carcinoma metastásico del tracto genital femenino, el TTF1 se debe utilizar con precaución, ya que con los adenocarcinomas primarios de pulmón, estos tumores también se pueden expresar con el TTF1. La tinción de PAX8 es útil para ayudar a identificar los tumores metastásicos de origen en el tracto genital femenino.
	16.5 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen urotelial del carcinoma pulmonar primario?	Una combinación de CK7, CK20 y GATA3 es muy útil para diferenciar el carcinoma urotelial metastásico del carcinoma de células escamosas pulmonar.

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
	16.6 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen renal del carcinoma pulmonar primario?	El PAX8 y el TTF1 son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico de células renales (PAX8+/TTF1-) del adenocarcinoma primario de pulmón (PAX8-/TTF1±). La napsina A no es útil en este contexto, ya que se expresa en una proporción variable de carcinomas de células renales.
	16.7 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen prostático del carcinoma pulmonar primario?	Se puede utilizar una combinación de CK7, CK20 y TTF1 negativos, junto con una tinción positiva para un marcador de próstata como el NK3 homeobox 1 (NKX3.1), para identificar el carcinoma prostático metastásico.
	16.8 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico de origen hepático del carcinoma pulmonar primario?	Para identificar el carcinoma hepatocelular metastásico se puede utilizar una combinación de marcadores hepatocelulares, como la arginasa-1 y la parafina de hepatocitos 1 (HepPar1), junto con marcadores negativos CK7 y pulmonares.
	16.9 ¿Cuáles marcadores de IHQ son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico de origen tiroideo del carcinoma pulmonar primario?	Una combinación de positividad de PAX8 y TTF1, junto con la ausencia de napsina A, es útil para identificar los carcinomas metastásicos de tiroides.
Capítulo 17		
El mesotelioma y la inmunohistoquímica	17.1 ¿Cuáles son los mejores marcadores para diferenciar el mesotelioma pleural maligno (MPM) epitelioide del carcinoma?	La calretinina y la proteína del tumor de Wilms (WT1) son los mejores marcadores mesoteliales positivos para el diagnóstico del MPM epitelioide. La claudina 4, el MOC31, el CEA monoclonal, el B72.3 y el Ber-EP4, en combinación con los marcadores específicos del lugar, son los mejores para diferenciar el carcinoma del MPM epitelioide.
	17.2 ¿Cuáles son los mejores marcadores para diferenciar el MPM sarcomatoide del carcinoma sarcomatoide?	El MPM sarcomatoide se puede diagnosticar con marcadores positivos de citoqueratinas y mesoteliales, más frecuentemente el D2-40 y la calretinina, mientras que los marcadores de carcinoma son negativos. Si las citoqueratinas son negativas, el diagnóstico diferencial debe incluir los sarcomas, y se debe considerar la posibilidad de ampliar el estudio para buscar fusiones/reordenamientos genéticos específicos.
	17.3 ¿Cuál es la función de las citoqueratinas en el diagnóstico del MPM?	Las tinciones con citoqueratinas son útiles para resaltar la celularidad pleural en todo su espesor, la falta de zonificación y la presencia de invasión de células mesoteliales en el tejido adiposo de la pared torácica.
	17.4 ¿Cuáles marcadores inmunohistoquímicos se pueden utilizar para diferenciar entre proliferaciones mesoteliales benignas y malignas?	La IHQ de la proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1) y la metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) (como sustituto de la delección homocigota de CDKN2A) pueden ser útiles para diferenciar la proliferación mesotelial benigna de la maligna en muestras quirúrgicas y de fluidos.
Capítulo 18		
Tumores tímicos e inmunohistoquímica	18.1 ¿Cuáles son los mejores marcadores para el diagnóstico del timoma?	Una combinación de queratina y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) constituye el mejor panel para el diagnóstico del timoma. También se puede utilizar el CD1a o el CD99 para marcar los linfocitos inmaduros tímicos.
	18.2 ¿Qué otros marcadores se pueden utilizar para resaltar las células epiteliales tímicas?	Los policlonales PAX8 y p40/p63 se pueden añadir al panel de queratina y TdT para la caracterización de los timomas.
	18.3 ¿Cómo puede ayudar la IHQ en la clasificación de los timomas?	La tinción de queratina puede revelar el patrón de las células epiteliales, lo que ayuda a la clasificación entre timomas B1 y B2.
	18.4 ¿Cómo se puede diferenciar el timoma del carcinoma tímico?	El diagnóstico diferencial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre el timoma tipo B3 y el carcinoma tímico puede ser difícil en muestras de biopsia pequeñas. La presencia de linfocitos TdT positivos favorece el diagnóstico del timoma. La expresión positiva del CD5 y/o del CD117 ayuda al diagnóstico del carcinoma tímico, así como al diagnóstico diferencial con el carcinoma de células escamosas de pulmón.
	18.5 ¿Cuáles son las tinciones útiles para el diagnóstico de los tumores de células germinales?	El SALL4 es un marcador tumoral de células germinales que se debería incluir en un panel para examinar estos tumores. Una vez que el SALL4 positivo sugiere un tumor de células germinales, el OCT3/4, el KIT (CD117), el CD30 y el glipicano 3 se pueden utilizar como clasificadores de seminoma y tumores no seminomatosos. Tras el examen histológico, se deben incluir y añadir otros marcadores, según corresponda.

Título	Preguntas clave	Respuestas breves
Capítulo 19		
Uso de la inmunohistoquímica en las pruebas de biomarcadores predictivos	19.1 ¿La IHQ tiene una función en la detección de alteraciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)?	La IHQ del EGFR WT no tiene actualmente un uso clínico recomendado de forma rutinaria. La IHQ para detectar una gama limitada de proteínas mutantes del EGFR se utiliza ocasionalmente en circunstancias particulares.
	19.2 ¿Cuál es la función de la IHQ en la detección de tumores con reordenamientos del gen ALK?	La IHQ de ALK tiene un papel fundamental en las pruebas de biomarcadores predictivos de ALK en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) en estadio avanzado.
	19.3 ¿Cuál es la función de la IHQ en la detección de tumores con reordenamientos del gen ROS1?	La IHQ del ROS1 es una técnica establecida para enriquecer las muestras de una población de pacientes con CPNM en estadio avanzado, a fin de confirmar el reordenamiento del gen ROS1 mediante un método molecular alternativo.
	19.4 ¿La IHQ tiene una función en la identificación de tumores con reordenamientos del gen de la tirosina quinasa neurotrófica (NTRK1-3)?	La prueba de IHQ para ayudar a la detección de reordenamientos del gen NTRK1-3 es una técnica emergente, pero sin una función establecida.
	19.5 ¿Las pruebas de IHQ tienen alguna función en las pruebas de biomarcadores predictivos para cualquier otra alteración genómica susceptible de responder al tratamiento?	No hay ninguna función establecida de las pruebas IHQ para la identificación de pacientes portadores de otras alteraciones susceptibles de responder al tratamiento.
	19.6 ¿Cuál es la función de la IHQ del PD-L1 en la selección de pacientes con CNM para la inmunoterapia?	Aunque se están buscando activamente biomarcadores alternativos para su uso con la inmunoterapia en el CNM, parece muy probable que la IHQ del PD-L1 siga formando parte de la evaluación necesaria de las muestras clínicas de CNM en relación con la proteína de muerte celular antiprogramada-1 (PD1) y la inmunoterapia con PD-L1. Sin embargo, aún existen interrogantes sobre las diferentes pruebas, los tipos de muestras, la expresión en el tumor en comparación con los inmunocitos y cómo se deben utilizar los datos de IHQ para la toma de decisiones clínicas.
	19.7 ¿Se puede utilizar la IHQ para evaluar el microentorno tumoral con el fin de seleccionar a los pacientes para la inmunoterapia?	Queda por determinar cómo se podrían evaluar y utilizar en el futuro los factores del microentorno tumoral. Esto debe estar basado en pruebas sólidas y en ensayos clínicos.

Introducción

1

Por Yasushi Yatabe, Keith M. Kerr, Alain C. Borczuk, Wendy A. Cooper
Sanja Dacic, Andre L. Moreira y Ming Sound Tsao

La inmunohistoquímica (IHQ) es una piedra angular del diagnóstico patológico; es por mucho la técnica complementaria más usada como ayuda en la identificación y clasificación de las enfermedades. Durante los últimos 30 años, los patólogos han aprovechado esta poderosa tecnología para transformar la manera en la que hacemos los diagnósticos en todo el espectro de la medicina patológica, pero especialmente en la patología tumoral. Las técnicas histoquímicas y la microscopía electrónica aún tienen su lugar, pero la IHQ es la técnica preferida para resolver un inconveniente.

Los marcadores inmunohistoquímicos son clave hoy en día para realizar un diagnóstico más preciso de cáncer de pulmón y otras neoplasias malignas torácicas. Muchos de los inconvenientes de la inmunohistoquímica son comunes en numerosas áreas del diagnóstico del cáncer, como el uso de las queratinas y otros marcadores epiteliales para identificar y diagnosticar el carcinoma, el uso de marcadores linfoides para identificar y clasificar los trastornos linfoproliferativos, y el uso de marcadores específicos de órganos en el diagnóstico de tumores metastásicos del pulmón, en donde el inmunofenotipo puede ser crucial para asegurar el diagnóstico correcto cuando la morfología es insuficiente. Los marcadores neuroendocrinos son importantes en el diagnóstico del espectro de tumores neuroendocrinos que ocurren en el pulmón, por ejemplo, para diferenciar los casos de carcinoma de pulmón microcítico (CPM) de los tumores no microcíticos (véase el siguiente análisis), ya que sus tratamientos son bastante diferentes. También se requieren marcadores neuroendocrinos para el diagnóstico del carcinoma neuroendocrino de células grandes, a fin de confirmar la diferenciación neuroendocrina en un tumor con una morfología apropiada. La IHQ es una parte fundamental del diagnóstico del mesotelioma maligno, ha permitido un diagnóstico preciso incluso en muestras muy pequeñas, y proporciona una mayor seguridad diagnóstica en un área en donde hay implicaciones medicolegales particulares para este diagnóstico. La expresión de algunas citoqueratinas y de antígenos asociados con las células T tímicas permite comprender mejor la clasificación morfológica del timoma, y la IHQ también hace posible un diagnóstico más seguro en muestras diagnósticas pequeñas en este contexto.

No obstante, la evolución de la medicina personalizada en el cáncer de pulmón y el surgimiento de varias terapias anticancerosas que se prescriben con base en características patológicas particulares del tumor del paciente le han dado a esta técnica un papel adicional y muy especial más allá de la visión tradicional de la IHQ como un complemento diagnóstico.

Como se mencionó anteriormente, la IHQ puede ser útil para diferenciar el CPM, que en un contexto avanzado se trata con combinaciones farmacológicas de platino/etopósido, en contraposición a los regímenes alternativos administrados para el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM). La aprobación de la terapia combinada de platino/pemetrexed para pacientes con CPNM no escamoso avanzado permitió que la IHQ tenga un papel fundamental en la determinación de la elección terapéutica para pacientes con CPNM en estadio avanzado. Cuando se dispone solamente de biopsias pequeñas y muestras de citología en la mayoría de los pacientes con enfermedad en estadio avanzado, entre el 25 % y el 40 % de los casos de CPNM no se pueden subtipificar con precisión más allá de la etiqueta de CPNM no especificado (NOS) únicamente con base en la morfología. Esto no era un impedimento para la terapia y era clínicamente aceptable en diagnósticos de CPNM-NOS antes de la introducción de diferentes regímenes de quimioterapia que dependen del subtipo de CPNM. Cuando la elección de la terapia se empezó a basar en un diagnóstico específico, la IHQ se convirtió en la herramienta clave para definir el diagnóstico de CPNM-NOS, reduciendo la prevalencia de estos casos a menos del 10 % mediante el uso prudente del factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) para predecir la histología del adenocarcinoma, así como el uso de p63 o p40 para predecir la histología escamosa. Este principio está incluido ahora en la clasificación de los tumores pulmonares de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En la clasificación de la OMS publicada en 2015, la IHQ también recibió un papel fundamental. La presencia de estos mismos marcadores, p40 y TTF1, recibió un estatus equivalente al de las características morfológicas clásicas en la *definición* del cáncer de células escamosas y del adenocarcinoma, respectivamente, en el contexto de un tumor resecado por vía quirúrgica. De este modo, la IHQ ha sido responsable de nuevos diagnósticos en probablemente dos tercios de los casos, los cuales previamente hubiesen sido diagnósticos de carcinoma de células grandes, carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma con base únicamente en una tinción IHQ positiva para p40 o TTF1.

Por último, y aunque no es el punto central de este atlas, la IHQ tiene un papel crucial en la identificación de los biomarcadores predictivos de terapia que permiten seleccionar a los pacientes para el tratamiento con un rango de expansión continua de terapias dirigidas, cuyo objetivo son los factores oncogénicos y otros factores moleculares importantes para el crecimiento de un tumor particular. Dada la propensión de estas dianas a presentarse en el adenocarcinoma, el diagnóstico del subtipo inicial del CPNM también es crucial para garantizar un triage preciso en casos de pruebas moleculares. La evolución de la inmunoterapia en el cáncer de pulmón ha permitido que la IHQ tenga papel aún más importante en la determinación de la terapia apropiada para los pacientes.

Está muy claro que, para lograr el mejor y más preciso de los diagnósticos para nuestros pacientes con neoplasias malignas torácicas, los patólogos deben entender cómo funciona la IHQ, cómo se usa, cuándo se usa y cómo se interpretan apropiadamente los resultados de las pruebas realizadas. En este atlas, miembros del Comité de Patología de la *International Association for the Study of Lung Cancer* han proporcionado una revisión sucinta, aunque integral, de muchos aspectos de la IHQ que son relevantes para el diagnóstico de los tumores torácicos, con base en un artículo de revisión publicado en el *Journal of Thoracic Oncology* (Yatabe et al., 2019). Es nuestro gran deseo que los lectores encuentren en este atlas una herramienta útil para contribuir a su trabajo.

Referencias

Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practice recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.

Relevancia clínica del diagnóstico preciso de neoplasias torácicas mediante inmunohistoquímica

2

Por Harvey I. Pass y Balazs Halmos

Valor de la inmunohistoquímica en la metodología diagnóstica de los nódulos pulmonares y la estadificación del cáncer de pulmón

Diagnósticos de cáncer de pulmón en nódulos pulmonares indeterminados

No todo paciente necesita una verificación histológica de una neoplasia maligna para que el cirujano considere que el nódulo es susceptible a una intervención preventiva. En pocos casos, las personas de alto riesgo se someten a una biopsia preoperatoria de nódulos subsólidos con componentes sólidos que se están desarrollando o creciendo, en especial si hay otras características indicativas de una neoplasia maligna; por ejemplo, un valor de captación estándar (SUVmax) elevado con tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada (TEP/TC). No obstante, existen casos en donde la confirmación absoluta de la histología es útil, específicamente para descartar un proceso benigno o en un paciente con una neoplasia maligna extratorácica previa, en cuyo caso se sugiere documentar la metástasis antes de la resección. En estos casos, las biopsias por aspiración con aguja fina o aguja gruesa, y la suplementación con paneles de inmunohistoquímica (IHQ) específicos para cáncer de pulmón, pueden ser invaluable para decidir el manejo adecuado. La suplementación IHQ también puede ser crucial para determinar si se está tratando con una situación inusual en la biopsia (eso incluye si un tumor es un nódulo benigno que se hace pasar como cáncer de pulmón) o para diferenciar el cáncer de pulmón microcítico de otras entidades en el espectro neuroendocrino. La diferenciación de las lesiones cavitadas, que pueden ser de origen micótico o micobacteriano derivado de un carcinoma cavitado, representan otro ejemplo en donde la histología y las tinciones especiales, particularmente la IHQ, pueden cambiar de manera drástica la terapia prescrita.

Diagnóstico del cáncer de pulmón

En algunos casos, la IHQ es crucial para el diagnóstico y la clasificación definitiva de los cánceres de pulmón. Dentro del ámbito de competencia del cirujano está operar para obtener el diagnóstico correcto y poder asegurarle al paciente que se realizó una resección completa. Obviamente, se pueden evitar errores en el tratamiento si el cirujano tiene un diagnóstico preoperatorio inequívoco de neoplasia maligna, y si el tipo de esta neoplasia, así como cualquier detalle de estadificación relacionado con la patología de la anormalidad, se diagnostican correctamente. Los cirujanos deben

realizar biopsias percutáneas con aguja gruesa y aspiraciones con aguja fina para el tratamiento de diversas condiciones del tórax, incluyendo cáncer de pulmón, nódulos benignos que se asemejan al cáncer de pulmón, y tumores mediastinales y pleurales. Para guiar la decisión del cirujano, la especificidad de una biopsia depende no solo del tamaño de la muestra con la que está trabajando el patólogo y del reconocimiento del patrón en una tinción con hematoxilina y eosina, sino también de paneles IHQ específicos que permitan diferenciar entre las condiciones benignas y las malignas, además de proporcionar información sobre el tipo de tumor maligno.

Estado del ganglio linfático e IHQ

El examen inmunohistoquímico de la adenopatía sospechosa, según su tamaño o la avidez en la TEP en un paciente con cáncer de pulmón presunto o diagnosticado, puede tener una aplicabilidad significativa. La determinación de las micrometástasis detectadas con cócteles de citoqueratinas u otros marcadores IHQ del cáncer de pulmón le proporciona suficiente información al cirujano para decidir si se debe remitir al paciente a la administración de regímenes de inducción o si es necesario operar primero. Además, en los pacientes con historial de leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño u otros linfomas indolentes, la confirmación de que la adenopatía sospechosa está relacionada con el linfoma y no con el cáncer de pulmón puede requerir de citometría de flujo, así como de paneles IHQ para linfoma.

Identidad errónea y confusa

La bibliografía publicada sobre oncología torácica está repleta de casos quirúrgicos que fueron “casi errores” o que se determinaron como “sorpresas” luego de la resección. Ha habido múltiples reportes de diferenciación entre infecciones, como las ocasionadas por *Klebsiella* (McCartney et al., 2014), actinomicosis (Papakonstantinou et al., 2019), y citomegalovirus (CMV) (Allen et al., 2005) del tumor mediante IHQ. Se han confundido las neumonías intersticiales descamativas con adenocarcinomas pulmonares que tienen zonas discohesivas y grandes números de células en los espacios aéreos (Raparia et al., 2014; Mutton et al., 1998). La IHQ con tinción para citoqueratina ha sido invaluable en la diferenciación del diagnóstico en esos casos.

Mesotelioma

El diagnóstico diferencial del paciente con una posible enfermedad pleural exige el uso de paneles de múltiples anticuerpos para decidir si la cirugía es apropiada. El uso de la pérdida de tinción para la proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1), así como la presencia de tinción para calretinina y para la proteína del tumor de Wilms (WT1), entre otros anticuerpos, además de la falta de tinción para adenocarcinoma y marcadores escamosos, ayuda al cirujano torácico a especializarse en el manejo del mesotelioma (véase el capítulo 17). En los pacientes con derrame pleural y con historia de neoplasias malignas también es posible que se identifique un mesotelioma por error, y la IHQ para el tumor primario con equivalencia a la IHQ de la enfermedad pleural permite descartar una cirugía citoreductora. Aunque existe una gran controversia sobre el uso de la cirugía para tratar el mesotelioma, es fundamental lograr el diagnóstico correcto mediante IHQ. La distinción entre los mesoteliomas y otras neoplasias malignas intratorácicas permite trazar el camino para iniciar el tratamiento apropiado y único de esta enfermedad, y también permite que los pacientes entiendan la etiología de su enfermedad, así como las implicaciones potencialmente legales y financieras. El reconocimiento de la histología sarcomatoide más agresiva permite también que el equipo clínico evite intervenciones de tratamiento, como cirugías extensas, que tienen un beneficio limitado en este subgrupo y que solo logran exponer a los pacientes a una morbilidad indebida por el tratamiento.

Carcinomas neuroendocrinos

Una distinción patológica muy importante que guía la toma de decisiones clínicas es la de la subtipificación de los carcinomas neuroendocrinos (véase el capítulo 10). Las pruebas IHQ apropiadas para evaluar la diferenciación neuroendocrina (NE) y la tinción para Ki-67 pueden ayudar a la clasificación adecuada y, de este modo, al ajuste óptimo de la terapia. Por lo general, los carcinoides típicos (tumores NE de bajo grado) y atípicos (de grado intermedio) se tratan según las pautas establecidas para los tumores NE gastrointestinales (GI) de bajo grado con análogos de la somatostatina, inhibidores de mTOR (everolimus) (Yao et al., 2011), fármacos dirigidos al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (sutinib) (Raymond et al., 2011) y, más recientemente, con terapia de radionucleidos para receptor de péptidos (Strosberg et al., 2017). La piedra angular de la terapia de las neoplasias malignas NE de alto grado, más agresivas, como los carcinomas NE de células grandes y los carcinomas microcíticos, ha sido tradicionalmente la quimioterapia combinada, con la integración reciente y la actividad demostrada de la terapia inhibidora de puntos de control. Estas combinaciones llevaron a la aprobación del atezolizumab en combinación con quimioterapia de carboplatino/etopósido y pembrolizumab para el manejo del cáncer de pulmón microcítico en estadio extenso (Horn et al., 2018; Chung et al., 2020).

Otras neoplasias malignas torácicas

La subtipificación apropiada de las neoplasias malignas tímicas, incluyendo los timomas invasivos, los carcinomas tímicos y los carcinoides, permite seleccionar el tratamiento óptimo, el pronóstico y la participación en estudios experimentales. La clasificación reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el papel importante de los estudios IHQ para la asignación del subtipo adecuado (Marx y et al., 2014; véase el capítulo 18). Un aspecto único en el manejo de las neoplasias malignas del timo es el de los síndromes paraneoplásicos, y estudios recientes señalan una frecuencia elevada de eventos adversos inmunes potencialmente severos con el uso de la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitario en esta clase de tumores (Lippner et al., 2019). Otros subgrupos emergentes con relevancia potencial para la terapia que tienen alteraciones moleculares susceptibles de responder al tratamiento son la proteína nuclear en los carcinomas de testículo (NUT) (Stathis et al., 2016; véase el capítulo 14) y las neoplasias malignas intratorácicas deficientes en *SMARCA4* (Le Loarer et al., 2015; véase el capítulo 15). Aunque no están clasificados como cánceres de pulmón no microcíticos, es importante reconocer los carcinomas sarcomatoides pulmonares, dada su naturaleza agresiva y su alta frecuencia para albergar alteraciones del exón 14 del *MET* (Liu et al., 2016) y la sensibilidad al tratamiento dirigido al *MET* y a la inmunoterapia (Schrock et al., 2017).

Enfermedad metastásica

Una distinción clave en el diagnóstico diferencial de las lesiones pulmonares, o la adenopatía hiliar/mediastinal/supraclavicular, es la enfermedad metastásica de otros órganos (véase el capítulo 16). Es fundamental la comunicación cuidadosa entre el clínico y el patólogo para garantizar que este último esté informado de los elementos históricos, clínicos y radiográficos claves del caso a fin de guiar la extensión de la metodología diagnóstica. Aunque el diagnóstico apropiado de una neoplasia maligna metastásica es de importancia crítica, el uso excesivo de tejido para una serie innecesaria de estudios IHQ en un caso de neoplasia maligna pulmonar conocida, en donde la biopsia se realiza para permitir que los estudios de biomarcadores guíen la terapia, puede tener consecuencias negativas significativas. Estudios recientes denotan que, aparte de los estudios IHQ, las pruebas moleculares expandidas pueden ayudar al reconocimiento del sitio del tumor primario/sincronicidad tumoral (Chang et al., 2019).

Consideraciones especiales acerca del uso de la IHQ para la selección del tratamiento

Marcadores pronósticos para la selección del tratamiento adyuvante

La clasificación histológica actual de la OMS para el adenocarcinoma define subtipos que se asocian con una mayor probabilidad de recurrencia y muerte (Warth et al., 2012; Tsao et al., 2015). No obstante, no todos los pacientes con enfermedad micropapilar o sólida tienen una recurrencia temprana, y se deben investigar otros métodos para lograr un pronóstico más preciso. Ciertos problemas morfológicos microscópicos, como la invasión linfovascular, la invasión pleural visceral y la diseminación tumoral a través de espacios alveolares (STAS), además de las características nucleares de alto grado, también han sido asociados con un fenotipo más agresivo; sin embargo, la incapacidad para predecir de manera exitosa la recurrencia con base en estas características es una de las razones por las que no se consideran como indicaciones absolutas para la terapia adyuvante. Esta interrelación entre características compatibles, que se asocian de manera coherente con recurrencia y/o muerte, además de la necesidad justificada para agregar terapias potencialmente beneficiosas, está influenciada también por la posibilidad de tratar de manera excesiva a los pacientes y ocasionar complicaciones tóxicas. La esperanza de que el pronóstico IHQ con anticuerpos únicos o múltiples pueda hacer más precisa la predicción de recurrencia comenzó hace más de 25 años con la tinción para oncoproteínas para erBB-2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano [HER2]/neu), p53, y Ki-67 en 271 pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (Harpole et al., 1995). Desde entonces, se han publicado cientos de reportes sobre los marcadores pronósticos basados en IHQ sin un impacto claro en la práctica (Zhu et al., 2006; Woodard et al., 2016; Seymour et al., 2019). Esto se puede explicar en gran medida por la falta de estandarización en los métodos IHQ utilizados, incluyendo la fuente y la calidad de los anticuerpos utilizados, el protocolo de tinción, el algoritmo de puntuación y el “corte”, además del abordaje estadístico para analizar los datos. La presencia de resultados inconsistentes también puede deberse al tamaño pequeño de muestra en algunos estudios, por lo que los casos incluidos son menos representativos. Los sesgos institucionales y de publicación también pueden desempeñar un papel importante (Zhu y Tsao, 2014). La mayoría de estos estudios carecían de grupos de validación y no pudieron realizar análisis multivariados para probar que el panel de una prueba IHQ simple es un factor pronóstico independiente de eventos.

Biomarcadores predictivos de IHQ

Una revisión realizada por Hung y Sholl (2018) detalló cuáles de las fusiones y mutaciones susceptibles de responder al tratamiento han acompañado a los anticuerpos específicos de IHQ. Los reordenamientos de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) se pueden detectar con los clones D5F3 (*Roche Tissue Diagnostics*) y 5A4 (*Leica*) con sensibilidades y especificidades mayores que el 95 %, y se pueden usar como pruebas independientes con el fin de seleccionar pacientes para terapias basadas en *ALK* (Lindeman et al., 2018; Tsao et al., 2016). El reordenamiento del oncogén 1 c-ros (*ROS1*), al igual que la *ALK*, por lo general se pueden diagnosticar mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH); Hung y Sholl (2018) enfatizan que, a pesar de una sensibilidad del 95 % con el clon D4D6 (*Cell Signaling Technology, Inc.*), la especificidad varía entre los estudios. En consecuencia, la IHQ para *ROS1* debe tener confirmación con un resultado positivo de otras plataformas (Lindeman et al., 2018); no obstante, se puede considerar que un resultado negativo de IHQ para *ROS1* es confiable para descartar una translocación *ROS1*. Los anticuerpos específicos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutante para L858R y para la delección E746-A750 del exón 19 tienen un rendimiento clínico variable, y el consenso general casi siempre es de una sensibilidad general del 59 % y una especificidad del 98 % (Ragazzi et al., 2016). Se han registrado resultados IHQ falsos positivos (Kitamura et al., 2010), y los tumores con resultados IHQ negativos específicos

para EGFR mutante se deben reevaluar con métodos moleculares en el caso de las mutaciones del EGFR. En consecuencia, los anticuerpos específicos para EGFR mutante no se deben usar como una prueba independiente para la terapia (Lindeman et al., 2018). En el capítulo 19 se discuten detalles adicionales.

Cáncer de pulmón de células escamosas

Los carcinomas de células escamosas continúan conformando una proporción sustancial de los cánceres de pulmón no microcíticos y se asocian fuertemente con historial de tabaquismo, lo que demuestra generalmente una carga mutacional tumoral intermedia/alta y un beneficio significativo de la terapia inhibitoria de puntos de control. La diferenciación patológica sigue siendo de suma importancia por varias consideraciones. En primer lugar, los estudios iniciales del anticuerpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumab, en pacientes con cánceres de pulmón no microcíticos avanzados resaltaron una toxicidad sustancial, a saber, riesgo elevado de hemoptisis, potencialmente fatal y muy común en pacientes con tumores de células escamosas (Johnson et al., 2004; [tabla 2-1](#)). No está claro si este riesgo elevado está relacionado con características biológicas o anatómicas (usualmente las masas centrales grandes con cavitación tienen el riesgo más alto y son más comunes con una histología escamosa); sin embargo, puesto que la aprobación del bevacizumab sigue estando limitada a los tumores no escamosos y existe una preocupación real por la toxicidad, es importante la confirmación histológica si se contempla el uso del bevacizumab. En segundo lugar, la genética molecular de los cánceres de pulmón de células escamosas es muy diferente de la de los adenocarcinomas, y casi siempre hay una probabilidad muy baja de identificar los hallazgos comunes que sean susceptibles a una intervención preventiva. Por lo tanto, en general, no se recomienda la realización de pruebas moleculares por adelantado para los carcinomas de células escamosas. En este caso específico, se debe hacer la salvedad de que el subgrupo poco común de no fumadores con cáncer de pulmón

Tabla 2-1. Tratamientos potenciales según las alteraciones genéticas

Diagnóstico (prueba)	Tratamiento potencialmente indicado	Tratamiento potencialmente excluido
CPNM escamoso	Necitumumab (anticuerpo monoclonal contra EGFR)	Bevacizumab (anticuerpo monoclonal contra VEGF)
CPNM no escamoso	Pemetrexed, bevacizumab	
Mutación del gen <i>EGFR</i>	TKI EGFR	Inmunoterapia
Translocación <i>ALK</i>	TKI ALK	Inmunoterapia
Translocación <i>ROS1</i>	TKI ROS1	
<i>BRAF</i> V600E	Terapia combinada BRAF/MEK	
Translocación <i>NTRK1/2/3</i>	Terapia inhibitoria TRK	
Alteración de omisión de exón 14 <i>MET</i>	TKI MET	
Translocación <i>RET</i>	TKI RET	
Mutación <i>ERBB2/HER2</i>	Inhibidores experimentales ERBB2	
PD-L1 positivo	Inmunoterapia de agente único	
Carcinoma NUT	Inhibidores experimentales BET/HiDAC	
Sarcomas torácicos deficientes en <i>SMARCA4</i>	Inhibidores experimentales EZH2	

Abreviaturas: *ALK* = quinasa del linfoma anaplásico; *BET* = dominio de bromo y extraterminal; *BRAF* = protooncogén B-raf; *EGFR* = receptor del factor de crecimiento epidérmico; *EZH2* = aumentador de homólogo 2 zeste; *HER2* = receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; HiDAC = citarabina en alta dosis; MEK = quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK); *MET* = protooncogén MET; CPNM = carcinoma de pulmón no microcítico; *NTRK* = quinasa del receptor neurotrópico de tirosina; NUT = proteína nuclear en testículo; PD-L1 = ligando 1 de muerte programada; *RET* = protooncogén ret; *ROS1* = oncogén 1 c-ros; TKI = inhibidor de la tirosina quinasa; VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular.

de células escamosas requiere de pruebas para la determinación del tipo de adenocarcinoma, ya que el rendimiento y la viabilidad son elevados (Sholl, 2017). Además, si existe un potencial razonable para una histología mixta (histología escamosa identificada a partir de una muestra muy pequeña), podría ser prudente realizar pruebas moleculares, aunque es difícil generar pautas claras para este subgrupo debido a la gran heterogeneidad de los tipos de muestras. Los carcinomas de células escamosas con mucha frecuencia son claramente positivos para la expresión del receptor del EGFR y, en efecto, el estudio elaborado por los Estándares para la Excelencia en el Reporte de la Mejoría de la Calidad (*Standards for Quality Improvement Reporting Excellence, SQUIRE*) demostró un beneficio estadísticamente significativo del anticuerpo monoclonal anti-EGFR, necitumumab, en combinación con la quimioterapia basada en doblete de platino en el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) escamoso avanzado que llevó a la aprobación por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA); a pesar de ello, debido al beneficio clínico limitado y al costo elevado, este tratamiento casi nunca se utiliza (Thatcher et al., 2015). Los estudios genómicos y proteómicos recientes resaltan subgrupos clave de tumores definidos molecularmente entre los tumores de células escamosas que, por ejemplo, se caracterizan por alteraciones en las vías oxidativas con significancia potencial para el tratamiento (Stewart et al., 2019).

Cáncer de pulmón no microcítico y no escamoso

Desde la perspectiva del tratamiento, la clasificación adecuada de un cáncer de pulmón no microcítico y no escamoso (que principalmente consiste en una mayoría de adenocarcinomas con un porcentaje de carcinomas de células grandes cada vez menor con el tiempo) ha ganado importancia con la introducción del pemetrexed, el antifolato de múltiples sitios de acción. Se demostró que el pemetrexed tiene excelente actividad y tolerancia en una serie de estudios en contextos de segunda y de primera línea, en pacientes con CPNM avanzado y análisis subgrupales de varios estudios que demuestran diferencias histológicas en términos de actividad, con una actividad inferior en pacientes con carcinomas de células escamosas (Scagliotti et al., 2008). Por el contrario, en pacientes con tumores no escamosos avanzados, los dobletes de quimioterapia con platino/pemetrexed se han convertido en los regímenes de quimioterapia de primera línea más comúnmente utilizados a nivel mundial, y también se usan de manera extensa en el contexto adyuvante (Scagliotti et al., 2011). Finalmente, con base en los estudios precedentes, la aprobación de este agente quimioterapéutico ampliamente usado y favorecido está restringida a los tumores no escamosos; por lo tanto, para el clínico y para el paciente, sigue siendo importante que el patólogo haga esta distinción, aunque esta interpretación es artificiosa y continúa siendo debatible. La introducción de las inmunoterapias no ha hecho que esta distinción sea menos importante, debido a que la combinación de quimioterapia/inmunoterapia para cáncer de pulmón no microcítico y no escamoso usada más comúnmente y basada en el estudio de alta positividad *KEYNOTE-189* sigue estando basada en el pemetrexed (Gandhi et al., 2018). Por lo general, en este contexto también se usa terapia de mantenimiento con pemetrexed solo para pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y no escamoso avanzado, al contrario de la recomendación de no administrar quimioterapia de mantenimiento en los tumores de células escamosas (Ciuleanu et al., 2009). Además, dada la frecuencia mucho mayor de alteraciones moleculares susceptibles a una intervención preventiva en los adenocarcinomas y los carcinomas de células grandes, se resalta la continua necesidad de una clasificación y distinción histológica apropiada (Chan et al., 2019).

Gestión de pruebas moleculares y de tejidos

Desde el descubrimiento de las mutaciones activadoras del gen *EGFR* para identificar un subgrupo tumoral definido molecularmente con alta sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR (Lynch et al., 2004), se ha producido una explosión de conocimiento que demuestra que, para

el manejo adelantado óptimo del cáncer de pulmón no microcítico avanzado, es necesario completar la genotipificación molecular amplia. Esto incluye, como mínimo, las pruebas para *EGFR/ALK/ROS*/protooncogén B-raf (*BRAF*), en donde existen datos generales para el uso adelantado de terapias dirigidas molecularmente y de alta eficacia (Lindeman et al., 2018; Halmos, 2018). Debido a los datos recientes que indican la actividad, así como las consecuentes aprobaciones por parte de la FDA, de los inhibidores de la tirosina quinasa (*NTRK*) neurotrópicos en el tratamiento de cánceres positivos para fusión *NTRK1/2/3*, también han adquirido gran importancia las pruebas para estas alteraciones susceptibles a una intervención preventiva, aunque no son muy comunes (Drilon et al., 2018a). Los datos emergentes sobre la susceptibilidad a una intervención preventiva de las alteraciones de omisión de exón 14 de *MET* (Drilon et al., 2020) y las translocaciones *RET* (Subbiah et al., 2018) permiten completar el grupo que actualmente podría responder al tratamiento. Finalmente, las alteraciones *HER2* (Pillai et al., 2017), las mutaciones G12C del homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (*KRAS*) (Lanman et al., 2020) y las fusiones de la neurregulina (*NRG1*) (Drilon et al., 2018B) son ahora el centro de atención de los estudios en curso, con datos promisorios que sugieren que su evaluación, como mínimo, puede permitir la participación del paciente en los ensayos clínicos en curso. En resumen; completar la genotipificación en forma adecuada con resultados positivos y negativos confiables, obtenidos de manera oportuna para guiar el manejo del tratamiento del paciente, requiere el desarrollo de protocolos de prueba refleja a nivel institucional. Esto denota la superioridad potencial de las pruebas multiplex, idealmente de secuenciación de nueva generación (NGS), en comparación con los métodos de las pruebas genéticas simples. Estos problemas requieren también de coordinación dedicada y cuidados extremos en cuanto a la gestión de tejidos para maximizar el rendimiento de las pruebas clínicamente relevantes y evitar un desperdicio innecesario de tejidos, lo que lleva a una genotipificación incompleta, la pérdida de oportunidades o potenciales riesgos y/o costos añadidos para los pacientes, sin contar la realización de más procedimientos invasivos. Sin embargo, incluso en la era de las pruebas NGS, la IHQ puede tener algún papel en la práctica real (Tsao y Yatabe, 2019).

Pruebas para PD-L1

Durante los últimos años, los inhibidores de puntos de control han transformado el panorama del manejo del cáncer de pulmón. En la actualidad, el estándar de atención para prácticamente todos los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado y cáncer de pulmón microcítico en estadio extenso incluye la terapia contra la proteína 1 de muerte celular programada (PD1), o la terapia contra el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), en combinación con quimioterapia, o como monoterapia con pembrolizumab para pacientes con un valor elevado en la puntuación de proporción tumoral (TPS) para PD-L1; es decir, cáncer de pulmón no microcítico positivo (Alexander et al., 2020). Además, la inmunoterapia con anticuerpo anti-PD-L1, durvalumab, está aprobada y es de uso amplio en el contexto de la terapia definitiva para cáncer de pulmón no microcítico no extirpable en estadio III, luego de la aplicación de quimiorradiación concurrente (Antonia et al., 2018). Hoy en día, se lleva a cabo una gran cantidad de estudios clínicos para conocer más sobre la utilidad de la inmunoterapia en estos contextos, así como para evaluar con más profundidad el papel de la inmunoterapia en casos de estadios más tempranos donde se puede anticipar que el impacto del tratamiento sea incluso más significativo.

Aunque los beneficios aportados mediante la inhibición de los puntos de control son claros, todavía no se ha definido con certeza cómo enriquecer las poblaciones de pacientes a fin de que los beneficios sean mayores y se reduzcan los impactos de la toxicidad. De la gran variedad de biomarcadores que se están estudiando, la IHQ para el PD-L1 sigue siendo el único biomarcador validado. Actualmente, su uso aprobado está relacionado con la determinación de la posibilidad de realizar un tratamiento adelantado con pembrolizumab del CPNM avanzado. Una puntuación TPS de la

IHQ para PD-L1 del 50 % o más define una población de pacientes en la que el pembrolizumab es superior a la quimioterapia de doblete. Una puntuación entre el 1 % y el 49 % define una población de pacientes intermedia, en donde la eficacia del pembrolizumab parece ser similar a la de la quimioterapia de doblete, pero con menos toxicidades (Lantuejoul et al., 2020). Puesto que el estándar de atención ya no es la quimioterapia de doblete, sino la quimioterapia/inmunoterapia para la mayoría de los pacientes, con base en los resultados de los estudios *KEYNOTE-189/407* e *Impower-150/130*, estos resultados se deben colocar en perspectiva e interpretar con precaución (Gandhi et al., 2018; Paz-Ares et al., 2018; Horn et al., 2018). Actualmente no hay un papel definido para las pruebas de PD-L1 en el manejo del cáncer de pulmón microcítico, y el durvalumab está aprobado por la FDA independientemente de los resultados de la prueba IHQ para PD-L1 en el CPNM de estadio III (aunque los análisis subgrupales indican un beneficio limitado, si es que hay alguno, en pacientes con puntajes TPS para PD-L1 de 0) (Grey et al., 2020). La serie de estudios *IMpower*, que evaluó el uso del anticuerpo anti-PD-L1, atezolizumab, se centró en un sistema de puntuación IHQ diferente para el PD-L1, incluyendo la positividad de los inmunocitos (TC/IC) (Vennapusa et al., 2019). Los resultados emergentes indican beneficios similarmente enriquecidos con la inmunoterapia de agente único en pacientes con puntuaciones TC/IC elevadas.

Aunque hay muchos inconvenientes con las pruebas IHQ para PD-L1 en cuanto a la selección de anticuerpos, el sistema de puntuación y la heterogeneidad temporal/intratumoral (Rimm et al., 2017; Lantuejoul et al., 2020), sigue siendo una prueba clínicamente relevante y recomendada para todos los pacientes con CPNM avanzado, tanto escamoso como no escamoso, con base en las consideraciones anteriores. Siguen existiendo grandes esperanzas en cuanto al surgimiento de más biomarcadores para optimizar la selección de pacientes con base en (1) la genética tumoral, como la carga mutacional tumoral (TMB) (con base en el ADN tumoral circulante o tisular [ctDNA]) (Vokes et al., 2019) y la inestabilidad microsatélite (MSI) (con menor impacto en el cáncer de pulmón debido a su baja frecuencia), así como marcadores genéticos únicos (por ejemplo, *STK11/KEAP1* como factores pronósticos negativos de la eficacia de la inmunoterapia [Skoulidis et al., 2018]) o (2) las firmas inmunes por medio de la expresión del ARN de genes selectivos con relación inmune (Socinski et al., 2018). Sin embargo, ninguno de estos biomarcadores ha alcanzado por ahora el nivel de validación para ser recomendado para uso diario.

Consideraciones emergentes para los estudios IHQ en los paradigmas evolutivos del tratamiento del cáncer de pulmón

Evaluación histológica luego de la terapia neoadyuvante

Con el aumento del uso de la terapia neoadyuvante en el manejo de grupos selectivos de pacientes con estadio mayor, o en la evaluación de la eficacia de los ensayos de ventana de oportunidad, es crucial un enfoque más estandarizado para la interpretación patológica de la respuesta a la terapia al momento de la resección postinducción. Las excelentes revisiones realizadas por Hellman et al. (2014) y Blumenthal et al. (2018) han enfatizado la precisión de la categoría del 0 al 10 % de células viables residuales como una respuesta patológica mayor (MPR), descrita originalmente por Pataer et al. (2012) como un sustituto para la supervivencia en ensayos neoadyuvantes. La cuantificación de la enfermedad residual viable puede requerir de una consideración específica del tipo de tratamiento que recibió la persona; es decir, quimioterapia en comparación con inmunoterapia. Las caracterizaciones de las respuestas relacionadas con la inmunoterapia han llevado a la proposición de criterios específicos de la respuesta patológica relacionada con la inmunidad (irPRC) (Cottrell et al., 2018). Desde luego, debe existir una estandarización de la evaluación de la MPR que posiblemente incluya la respuesta en los ganglios linfáticos regionales, y la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) acaba de publicar la recomendación sobre la evaluación de la MPR (Travis et al.,

2020). Sin embargo, la estandarización se puede ajustar al usar plataformas inmunofluorescentes multiplexadas (Parra et al., 2018), así como perfilado espacial digital (Beechem 2020) de regiones de interés específicas en la interpretación del lecho tumoral residual.

Resistencia adquirida y transformaciones histológicas

La terapéutica dirigida ha mejorado drásticamente la atención a los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado que tienen alteraciones susceptibles a una intervención preventiva; no obstante, la resistencia adquirida representa un problema en este contexto. Aun cuando la resistencia adquirida se entiende mejor en el contexto del cáncer de pulmón con mutación de EGFR, parece que los mismos paradigmas se aplican a todos los demás subgrupos de enfermedades en donde se dispone de terapéutica dirigida eficaz a nivel molecular (Attarian et al., 2017; Lim y Ma, 2019). En general, la resistencia adquirida está determinada por cambios genéticos secundarios o por cambios epigenéticos en el tumor, los cuales impactan de forma muy predecible los tres aspectos a continuación:

1. Alteraciones de la vía, normalmente mutaciones secundarias del gen objetivo, las cuales afectan con frecuencia las características de fijación de fármacos de la proteína objetivo. El mejor ejemplo conocido de este caso es la ocurrencia común de la mutación T790M del gen *EGFR* que controla la proliferación celular en los inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR de primera o de segunda generación (Kobayashi et al., 2005). Estas mutaciones secundarias pueden ser sensibles a los agentes de nueva generación y, de este modo, pueden guiar el ajuste del tratamiento.
2. Alteraciones de bypass (por ejemplo, la amplificación MET), las cuales representan una alteración potencialmente susceptible a una intervención preventiva con el uso de terapia dirigida combinada que bloquee ambas vías (Nguyen et al., 2009).
3. Transformación histológica, la cual se observa más comúnmente como transformación microcítica en tumores que casi siempre albergan coalteraciones del TP53, del retinoblastoma (RB) o de la subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (*PIK3CA*). Estos tumores de tipo microcítico pueden responder a regímenes de tratamiento dirigidos a células pequeñas, lo que hace necesaria una detección apropiada.

Recientemente, también se han observado, con una frecuencia cada vez mayor, otras transformaciones histológicas a carcinoma de células escamosas y carcinoma sarcomatoide (Schoenfeld et al., 2020). En general, el remuestreo molecular tiene un valor cada vez mayor, lo que lleva a una mejor comprensión, diseños de ensayos experimentales optimizados y, más importante aún, una mejora en la atención diaria del paciente. Aunque en la actualidad se suelen realizar inicialmente pruebas moleculares a través de las pruebas de ctDNA, todavía es frecuente pedir pruebas tisulares cuando las pruebas del ctDNA no brindan información o cuando existen sospechas de transformación histológica. En estos contextos, la comunicación cuidadosa entre los oncólogos y los patólogos es de fundamental importancia para una priorización apropiada del tejido disponible para las pruebas IHQ convencionales, que permitan diagnosticar adecuadamente las neoplasias malignas y la transformación histológica al preservar el tejido para plataformas de pruebas NGS que puedan definir con sumo cuidado el creciente espectro de alteraciones potenciales de resistencia adquirida.

Conclusiones

Existe una necesidad cada vez mayor de preservar el tejido para practicar una gestión tisular prudente durante el trabajo diagnóstico. Además, algunos de los núcleos de tejidos se consideran ideales para los estudios de investigación que requieren la aplicación de mejores prácticas a lo largo del proceso diagnóstico en cuanto a la obtención de tejidos con la mayor seguridad posible. La utilización

cuidadosa de los estudios IHQ representa un elemento clave para maximizar el rendimiento diagnóstico, minimizar la necesidad de repetir procedimientos y, por lo tanto, optimizar el rendimiento y los tiempos de entrega para el inicio del tratamiento.

Referencias

- Alexander M, Ko B, Lambert R, et al. The evolving use of pembrolizumab in combination treatment approaches for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med.* 2020;14(2):137-147.
- Allen TC, Bag R, Zander DS, Cagle PT. Cytomegalovirus infection masquerading as carcinoma in a lung transplant patient. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(1):e1-3.
- Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;379(24):2342-2350.
- Attarian S, Rahman N, Halmos B. Emerging uses of biomarkers in lung cancer management: molecular mechanisms of resistance. *Ann Transl Med.* 2017;5(18):377.
- Beechem JM. High-plex spatially resolved RNA and protein detection using digital spatial profiling: a technology designed for immuno-oncology biomarker discovery and translational research. *Methods Mol Biol.* 2020;2055:563-583.
- Blumenthal GM, Bunn PA Jr., Chaft JE, et al. Current status and future perspectives on neoadjuvant therapy in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(12):1818-1831.
- Chan AW, Chau SL, Tong JH, et al. The landscape of actionable molecular alterations in immunomarker-defined large-cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol.* 2019;14(7):1213-1222.
- Chang JC, Alex D, Bott M, et al. Comprehensive next-generation sequencing unambiguously distinguishes separate primary lung carcinomas from intrapulmonary metastases: comparison with standard histopathologic approach. *Clin Cancer Res.* 2019;25(23):7113-7125.
- Chung HC, Piha-Paul SA, Lopez-Martin J, et al. Pembrolizumab after two or more lines of previous therapy in patients with recurrent or metastatic SCLC: results from the KEYNOTE-028 and KEYNOTE-158 studies. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):618-627.
- Ciuleanu T, Brodowicz T, Zielinski C, et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet.* 2009;374(9699):1432-1440.
- Cottrell TR, Thompson ED, Forde PM, et al. Pathologic features of response to neoadjuvant anti-PD-1 in resected non-small-cell lung carcinoma: a proposal for quantitative immune-related pathologic response criteria (irPRC). *Ann Oncol.* 2018;29(8):1853-1860.
- Drilon A, Clark JW, Weiss J, et al. Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. *Nat Med.* 2020;26(1):47-51.
- Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731-739. (a)
- Drilon A, Somwar R, Mangatt BP, et al. Response to ERBB3-directed targeted therapy in NRG1-rearranged cancers. *Cancer Discov.* 2018;8(6):686-695. (b)
- Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2078-2092.
- Gray JE, Villegas A, Daniel D, et al. Three-year overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC-update from PACIFIC. *J Thorac Oncol.* 2020;15(2):288-293.
- Halmos B. Molecular testing in lung cancer: where to draw the line?. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(7):787-789.
- Harpole DH Jr., Herndon JE 2nd, Wolfe WG, et al. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res.* 1995;55(1):51-56.
- Hellmann MD, Chaft JE, William WN Jr., et al. Pathological response after neoadjuvant chemotherapy in resectable non-small-cell lung cancers: proposal for the use of major pathological response as a surrogate endpoint. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):e42-50.
- Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(23):2220-2229.
- Hung YP, Sholl LM. Diagnostic and predictive immunohistochemistry for non-small cell lung carcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2018;25(6):374-386.
- Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(11):2184-2191.
- Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, et al. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(13):3349-3355.

- Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2005;352(8):786-792.
- Lanman BA, Allen JR, Allen JG, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the treatment of solid tumors. *J Med Chem*. 2020;63(1):52-65.
- Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, et al. PD-L1 Testing for lung cancer in 2019: perspective from the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol*. 2020;15(4):499-519.
- Le Loarer F, Watson S, Pierron G, et al. SMARCA4 inactivation defines a group of undifferentiated thoracic malignancies transcriptionally related to BAF-deficient sarcomas. *Nat Genet*. 2015;47(10):1200-1205.
- Lim ZF, Ma PC. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):134.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):323-358.
- Lippner EA, Lewis DB, Robinson WH, et al. Paraneoplastic and therapy-related immune complications in thymic malignancies. *Curr Treat Options Oncol*. 2019;20(7):62.
- Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol*. 2016;34(8):794-802.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-2139.
- Marx A, Ströbel P, Badve SS, et al. ITMIG consensus statement on the use of the WHO histological classification of thymoma and thymic carcinoma: refined definitions, histological criteria, and reporting. *J Thorac Oncol*. 2014;9(5):596-611.
- McCartney C, Moghadam A, Sriram KB. Lung adenocarcinoma masquerading as refractory *Klebsiella pneumoniae*. *BMJ Case Rep*. 2014;2014.
- Mutton AE, Hasleton PS, Curry A, et al. Differentiation of desquamative interstitial pneumonia (DIP) from pulmonary adenocarcinoma by immunocytochemistry. *Histopathology*. 1998;33(2):129-135.
- Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer*. 2009;10(4):281-289.
- Papakonstantinou NA, Vlachou G, Vourlakou C, et al. Pulmonary actinomycosis masquerading as lung cancer: keep it in mind. *ANZ J Surg*. 2019;89(7-8):966-968.
- Parra ER, Villalobos P, Behrens C, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on the immune microenvironment in non-small cell lung carcinomas as determined by multiplex immunofluorescence and image analysis approaches. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):48.
- Pataer A, Kalhor N, Correa AM, et al. Histopathologic response criteria predict survival of patients with resected lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol*. 2012;7(5):825-832.
- Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2040-2051.
- Pillai RN, Behera M, Berry LD, et al. HER2 mutations in lung adenocarcinomas: a report from the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer*. 2017;123(21):4099-4105.
- Ragazzi M, Tamagnini I, Bisagni A, et al. Diamond: immunohistochemistry versus sequencing in EGFR analysis of lung adenocarcinomas. *J Clin Pathol*. 2016;69(5):440-447.
- Raparia K, Ketterer J, Dalurzo ML, et al. Lung tumors masquerading as desquamative interstitial pneumonia (DIP): report of 7 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(7):921-924.
- Raymond E, Dahan L, Raoul JL, et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors [published correction appears in *N Engl J Med*. 2011;364(11):1082]. *N Engl J Med*. 2011;364(6):501-513.
- Rimm DL, Han G, Taube JM, et al. A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(8):1051-1058.
- Scagliotti G, Brodowicz T, Shepherd FA, et al. Treatment-by-histology interaction analyses in three phase III trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(1):64-70.
- Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3543-3551.
- Schoenfeld AJ, Chan JM, Kubota D, et al. Tumor analyses reveal squamous transformation and off-target alterations as early resistance mechanisms to first-line osimertinib in EGFR-mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*. Published online January 7, 2020. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3563

- Schrock AB, Li SD, Frampton GM, et al. Pulmonary sarcomatoid carcinomas commonly harbor either potentially targetable genomic alterations or high tumor mutational burden as observed by comprehensive genomic profiling. *J Thorac Oncol.* 2017;12(6):932-942.
- Seymour L, Le Teuff G, Brambilla E, et al. LACE-Bio: Validation of predictive and/or prognostic immunohistochemistry/histochemistry-based biomarkers in resected non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2019;20(2):66-73.e6.
- Sholl L. Molecular diagnostics of lung cancer in the clinic. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(5):560-569.
- Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2018;8(7):822-835.
- Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378(24):2288-2301.
- Stathis A, Zucca E, Bekradda M, et al. Clinical response of carcinomas harboring the BRD4-NUT oncoprotein to the targeted bromodomain inhibitor OTX015/MK-8628. *Cancer Discov.* 2016;6(5):492-500.
- Stewart PA, Welsh EA, Slebos RJC, et al. Proteogenomic landscape of squamous cell lung cancer. *Nat Commun.* 2019;10(1):3578.
- Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, et al. Phase 3 trial of 177Lu-dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.* 2017;376(2):125-135.
- Subbiah V, Velcheti V, Tuch BB, et al. Selective RET kinase inhibition for patients with RET-altered cancers. *Ann Oncol.* 2018;29(8):1869-1876.
- Thatcher N, Hirsch FR, Luft AV, et al. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):763-774.
- Travis WD, Dacic S, Wistuba I, et al. IASLC multidisciplinary recommendations for pathologic assessment of lung cancer resection specimens after neoadjuvant therapy. *J Thorac Oncol.* 2020;15(5):709-740.
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, eds. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer.* 2.^a ed. IASLC; 2016.
- Tsao MS, Marguet S, Le Teuff G, et al. Subtype classification of lung adenocarcinoma predicts benefit from adjuvant chemotherapy in patients undergoing complete resection. *J Clin Oncol.* 2015;33(30):3439-3446.
- Tsao MS, Yatabe Y. Old soldiers never die: is there still a role for immunohistochemistry in the era of next-generation sequencing panel testing?. *J Thorac Oncol.* 2019;14(12):2035-2038.
- Vennapusa B, Baker B, Kowanetz M, et al. Development of a PD-L1 complementary diagnostic immunohistochemistry assay (SP142) for atezolizumab. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2019;27(2):92-100.
- Vokes NI, Liu D, Ricciuti B, et al. Harmonization of tumor mutational burden quantification and association with response to immune checkpoint blockade in non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol.* 2019;3:10.1200/PO.19.00171.
- Warth A, Muley T, Meister M, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol.* 2012;30(13):1438-1446.
- Woodard GA, Jones KD, Jablons DM. Lung cancer staging and prognosis. *Cancer Treat Res.* 2016;170:47-75.
- Yao JC, Shah MH, Ito T, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.* 2011;364(6):514-523.
- Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multi-phase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol.* 2006;59(8):790-800.
- Zhu CQ, Tsao MS. Prognostic markers in lung cancer: is it ready for prime time? *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(3):149-158.

Principios de la inmunohistoquímica

3

Por Erik Thunnissen y Alain C. Borczuk

Introducción

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que permite la visualización de proteínas en cortes histológicos; un método similar en muestras citológicas recibe el nombre de *inmunocitoquímica*. Con la IHQ, el dominio variable del anticuerpo primario reconoce y se une a un antígeno, que usualmente es un epítipo proteico. Estos epítipos pueden reflejar estructuras proteicas secundarias y terciarias pero los anticuerpos monoclonales se desarrollan ahora con más frecuencia contra péptidos de 4-25 aminoácidos (Saper, 2009), haciendo que la detección en tejido fijado en formalina luego de la recuperación del antígeno sea más viable. Para visualizar la localización del epítipo, se utiliza un segundo anticuerpo que se une al anticuerpo primario, así como reacciones químicas posteriores, como parte de un proceso conocido como *realce de la señal*. La ubicación de la tinción IHQ se detecta en el contexto tisular con la ayuda de un microscopio. La tinción IHQ se puede ubicar en una o más áreas subcelulares, como en la membrana celular, en el citoplasma o en el núcleo. La IHQ representa un método rápido y relativamente económico, preferido por muchos patólogos, principalmente porque permite la evaluación de la arquitectura tisular y de las células tumorales (Tsao et al., 2017).

Protocolos y procedimientos para inmunohistoquímica

Los principales pasos en el análisis de la IHQ son (1) la recuperación del epítipo, (2) la incubación con el anticuerpo primario y (3) el realce de la señal y el sistema de visualización (Taylor y Rudbeck, 2013). Los cortes histológicos usualmente se montan en una lámina de vidrio con un recubrimiento especial que mantiene adherido el corte al vidrio durante el procedimiento de IHQ. La recuperación del epítipo permite revelar (desenmascarar) los antígenos que pudieran haber estado enmascarados durante el procedimiento de fijación. La mayoría de estas técnicas involucran una combinación de calor con un pH alto o bajo para revertir los enlaces cruzados proteicos ocasionados por la fijación; los métodos más agresivos utilizan proteasas para segmentar las proteínas en epítipos peptídicos más pequeños. Puesto que durante el paso del realce de la señal y su visualización se utilizan enzimas exógenas, un paso de bloqueo impide el efecto de posibles enzimas endógenas funcionalmente similares.

Los dominios variables del anticuerpo primario se unen al epítipo de la proteína de interés. El anticuerpo primario se diluye en una solución amortiguadora, lo que facilita la unión durante la incubación. Para obtener resultados estables, es importante estandarizar la temperatura y el tiempo de este paso de incubación.

En el método de IHQ *directa* (véase el capítulo 4), el anticuerpo primario también porta una marca para su visualización. Sin embargo, es necesario que la concentración de los epítipos en el corte histológico sea muy elevada para que se pueda detectar por vía microscópica una señal a través de esta técnica.

En el método de IHQ *indirecta* (véase el capítulo 4), se necesita una segunda incubación, en donde los dominios variables de un anticuerpo secundario se unen a los dominios constantes del anticuerpo primario. El anticuerpo secundario porta una enzima que se utiliza para facilitar la visualización. El método con IHQ indirecta proporciona un realce de señal más fuerte, lo que implica que se pueden detectar proteínas en un corte con una concentración menor de epítipos en comparación con el método directo (Prinsen et al., 2003). Un desarrollo relativamente reciente es el uso de un polímero de dextrano que contiene varios anticuerpos secundarios, así como enzimas, para la visualización. El efecto de este método con realce de señal (como el obtenido al usar múltiples bombillas en vez de una sola) es 10 a 20 veces más intenso que la IHQ indirecta con una enzima en el anticuerpo secundario, lo que permite detectar concentraciones de epítipos incluso menores.

Luego de la incubación con una fracción de realce y del lavado, se añade una solución cromógena. Por lo general, el cromógeno soluble presente en la solución es incoloro. La enzima añadida en el paso de realce (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) transfiere el cromógeno a un sustrato insoluble que se precipita en el lugar del complejo anticuerpo primario-secundario; es decir, en la ubicación de la proteína. El tamaño del precipitado depende de la cantidad y ubicación del epítipo en una célula y, cuando es visible, es mínimamente igual a la resolución del microscopio de luz (500 nm o 0,5 μm), pero también puede llenar de manera acumulativa todo el citoplasma (20-30 μm).

Luego del paso de visualización IHQ y del lavado, se realiza una contratinción nuclear que facilita el reconocimiento de los núcleos y de la arquitectura tisular subyacente. Los pasos de lavado entre los pasos principales buscan eliminar los productos y solventes no unidos, manteniendo limpio el fondo del corte histológico.

Posteriormente, los cortes en las láminas de vidrio microscópicas se deshidratan y cubren con un medio de montaje (con un índice de refracción de 1,5, el mismo que el del vidrio) y un cubreobjetos de vidrio delgado. Esto conlleva la formación de planos paralelos de vidrio por encima y debajo del corte histológico, lo que evita el efecto de angulado que se observa como cuando una vara sobresale de la superficie del agua.

Evaluación e interpretación

Prinsen et al. demostraron en el 2003 la relación entre la concentración del epítipo y la intensidad de la señal para diferentes sistemas de realce, que se ilustra de manera gráfica en la [figura 3-1](#). Las diferencias en la intensidad de la curva en forma de S se pueden categorizar de manera semicuantitativa como negativas, positivas (+), doble positivas (++) o triple positivas (+++). Una vez que se alcanza la meseta de la intensidad máxima (+++), un incremento adicional en la concentración del epítipo no llevará a una mayor intensidad. El rango entre un valor negativo y uno +++ es bastante estrecho y abarca una concentración de epítipo de dos a cuatro veces, dependiendo del sistema de amplificación. Aunque puede haber un paralelismo con el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) como una prueba de detección cuantitativa de proteínas, la IHQ solo es cuantitativa en el rango dinámico lineal (la parte empinada de la curva en forma de S, es decir, el rango entre + y ++). En consecuencia, la IHQ es semicuantitativa en el

mejor de los casos, y solo en este rango de la curva. Por lo tanto, la señal se puede saturar y ser no cuantitativa.

La utilización de una amplificación de señal adicional con tiramida en una prueba comercial en la IHQ para cinasa del linfoma anaplásico (ALK) resultó en una IHQ cualitativa (consecuentemente con una línea casi vertical en la curva en forma de S empinada): El resultado de la prueba de IHQ en este contexto es puramente cualitativo; bien sea negativo o positivo (Wynes et al., 2014). Un sistema de amplificación más fuerte puede llevar de manera ocasional a un aumento en la tinción del fondo y, posiblemente, a resultados falsos positivos (Ibrahim et al., 2016).

La determinación de la intensidad de la tinción posee un elemento subjetivo que, en la práctica, se puede reducir con el uso de lentes objetivos sucesivos del microscopio, usando una resolución espacial relacionada inherente como una ayuda física para establecer el nivel de intensidad. Este método, utilizado por primera vez en la evaluación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), puede llevar a una puntuación más uniforme de la intensidad (Ruschoff et al., 2010). Se puede visualizar con claridad una tinción fuerte (+++) con el uso de un lente objetivo de microscopio de 2,5× o 5×; la tinción moderada (++) requiere un lente objetivo de 10× o 20× para observarla con claridad; por último, la tinción débil (+) solo se puede observar con un lente objetivo de 40× (Ruschoff et al., 2013).

Anticuerpos monoclonales de conejo y de ratón

Aunque los anticuerpos monoclonales de ratón son de amplio uso, los anticuerpos monoclonales de conejo tienen características de rendimiento que favorecen cada vez más su uso. Específicamente, el sistema inmunitario de los conejos responde a péptidos humanos que no son reactivos en el sistema inmunitario de los ratones y, en general, producen anticuerpos con mayor afinidad. Esto es especialmente cierto para los péptidos más pequeños, los cuales se usan como antígenos para la producción de anticuerpos (Rief y cols. 1998; Weber et al., 2017).

Pruebas desarrolladas en laboratorio

Se dispone de muchas pruebas comerciales para ensayos diagnósticos y predictivos. Los costos de las pruebas predictivas son drásticamente mayores que los de las pruebas diagnósticas, y las pruebas comerciales diagnósticas son más costosas que las pruebas desarrolladas en laboratorio (laboratory-developed tests, LDT). En épocas donde la mayoría de los laboratorios tienen presupuestos limitados, el reto económico con las pruebas predictivas promueve el uso de una LDT en lugar de una prueba comercial.

La ventaja de una prueba comercial es que la mayoría de los aspectos de la prueba/kit de IHQ han sido rigurosamente evaluados, y las condiciones para la prueba se han elegido para obtener resultados estables a tiempo. Es necesario desarrollar las LDT para realizarlas con los mismos estándares.

Estandarización de la IHQ

Idealmente, y de manera similar al ensayo *ELISA*, se debe disponer de un estándar de referencia o calibración para las pruebas de IHQ, pero, en la patología diaria, se carece de este estándar IHQ. Se

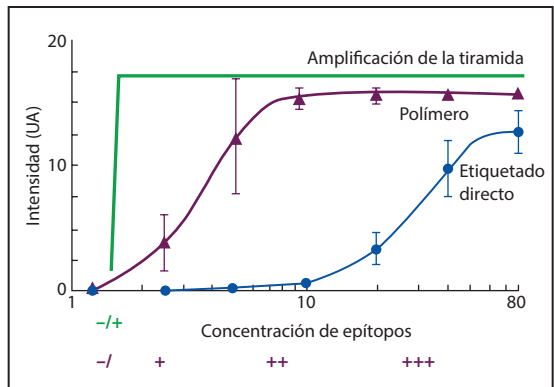


Figura 3-1. Relación entre la concentración del epítipo y el realce de la señal en inmunohistoquímica (IHQ). UA = unidad arbitraria. (Modificado con autorización de Prinsen et al., 2003)

requiere estandarización debido a que la inconsistencia en la preparación de la muestra (variables preanalíticas) y las validaciones inadecuadas de los reactivos (variables analíticas) pueden influenciar (casi siempre disminuir) los resultados de las pruebas de IHQ.

La lista de variables preanalíticas comprende, como mínimo: el tipo de fijador; el tiempo transcurrido en el fijador; los reactivos y las condiciones de la deshidratación, el aclaramiento y la impregnación en parafina; y las condiciones del secado y almacenamiento de la lámina (Engel y Moore, 2011). Durante la fijación, la tasa de penetración del formaldehído neutro amortiguado puede ser relativamente rápida en muestras pequeñas (1 mm/h) (Howat y Wilson, 2014), pero es mucho más lenta (0,2 mm/h) en el pulmón colapsado con múltiples capas delgadas de aire entre las paredes alveolares (van Seijen et al., 2019). El retraso en la fijación puede reducir la estabilidad proteica y, de este modo, obstaculizar la IHQ (van Seijen et al., 2019). Los efectos desfavorables de la fijación retrasada también se pueden ver en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, como el desprendimiento epitelial de la membrana basal, así como los núcleos picnóticos o casi picnóticos (Radonic et al., 2019). Estas muestras no se deben utilizar para la validación analítica de la IHQ. En el capítulo 5 se discute en más detalle la manipulación de los tejidos.

Para comenzar el desarrollo de una LDT, es útil una muestra de control con una concentración elevada de epítipo, ya que esta debería ser positiva bajo condiciones iniciales posiblemente subóptimas. Cuando este control es positivo, y el control negativo (por ejemplo, el procedimiento completo, excepto por el paso con el anticuerpo primario) es negativo, las muestras con una menor concentración de epítipo son útiles para el ajuste fino de las LDT.

La muestra óptima para el monitoreo del rendimiento diario, así como para la validación de una prueba IHQ, es aquella muestra con suficiente concentración de epítipo cercana al umbral como para considerarla positiva (usualmente +). La automatización del procedimiento de IHQ en instrumentos específicos (por ejemplo, temperaturas y tiempos de incubación de control) aumenta la estabilidad de las condiciones y la solidez del resultado IHQ en gran medida, lo que permite obtener resultados consistentes.

Validación de la IHQ

De acuerdo con las pautas del *College of American Pathologists* (CAP) para la validación analítica inicial de las pruebas IHQ no predictivas (*diagnósticas*), los laboratorios deben evaluar un mínimo de 10 tejidos positivos y 10 negativos (Fitzgibbons et al., 2014). Cuando el director médico del laboratorio determina que menos de 20 casos de validación son suficientes para un marcador específico (por ejemplo, un antígeno poco frecuente, lo que implica casos positivos poco frecuentes), se debe documentar el razonamiento para esa decisión. Para fines diagnósticos, cuando se dispone de muestras de calidad suficiente para la prueba IHQ, la concordancia con el ensayo de prueba debe ser alta (preferiblemente del 100 %, implicando una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 %).

Cuando se toman en cuenta muestras clínicas (consecutivas), no siempre pueden entrar en juego factores preanalíticos controlables, lo que explica la recomendación de que “para la validación inicial de toda prueba usada clínicamente, los laboratorios deben lograr una concordancia general de al menos el 90 % entre la prueba nueva y la prueba comparadora o los resultados esperados” (Fitzgibbons et al., 2014).

Para la validación analítica inicial de todas las pruebas con marcadores *predictivos* desarrollados por laboratorios, los laboratorios deben evaluar un mínimo de 20 casos positivos y 20 negativos, de acuerdo con el CAP (Fitzgibbons et al., 2014), y 50 muestras positivas y 50 negativas, de acuerdo con el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Garrett et al., 2008). Estas cifras tienen un componente arbitrario, con menores intervalos de confianza en el caso de las muestras. Otras pautas no abordan este tema o no son tan explícitas. Ambas pautas (CAP y CLSI) mencionan la concordancia del 90 % con la prueba comparadora. No obstante, ambas pautas tienen una falla: la tasa de

concordancia depende de la composición de los casos. La diferencia entre la validación *analítica/técnica* de una prueba diagnóstica y la validación *clínica* de una prueba predictiva es que esta última se asocia con una respuesta prevista para un tratamiento específico. En este aspecto, se debe establecer un propósito para la validación de una prueba LDT de IHQ, puesto que la validación correcta requiere que las muestras de control y el rango de trabajo para la detección del antígeno sean apropiados según la prueba. Este concepto de “adecuado según los objetivos” es de gran importancia, ya que el mismo anticuerpo podría requerir una validación diferente con base en este principio. Por ejemplo, para estar en el rango de trabajo correcto para tener utilidad diagnóstica, la detección de GATA3 en el carcinoma de mama en comparación con los linfocitos puede requerir un protocolo diferente con base en las diferencias en el nivel del antígeno (Cheung et al., 2017a). Además de la validación inicial, una LDT también es sujeto de una potencial revalidación con nuevos lotes de anticuerpos, nuevos clones de anticuerpos o cambios en el protocolo o el equipo de prueba.

En el caso de la IHQ para ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), se considera que cualquier intensidad de la tinción membranosa en, al menos, el 50 % de las células tumorales es positiva, ya que esta prueba predictiva está directamente validada por los datos clínicos de un ensayo aleatorizado de fase 3 (Reck et al., 2016). Conceptualmente, el camino a seguir es la validación clínica usando las muestras de los estudios de fase 3 (con resultados conocidos del paciente) y la comparación con el rendimiento de la nueva prueba para PD-L1. No obstante, la disponibilidad de tejido tumoral de estos estudios (con biopsias principalmente pequeñas) es limitada e impide la realización de pruebas extensas. Un método alternativo consiste en la comparación de la prueba que será validada con la misma prueba comercial para PD-L1 utilizada en el estudio de fase 3, puesto que el umbral validado por el estudio está asociado con el resultado clínico. En este método se asume que la prueba comercial es consistente en tiempo y lugar.

Recientemente, se proporcionó por primera vez una pauta más específica acerca de cómo realizar la validación *clínica* de la IHQ para PD-L1 (Thunnissen, 2019a). A tal fin, son adecuadas las muestras críticas (Thunnissen et al., 2018; Thunnissen, 2019b) que tienen una concentración de epítipo cercana al umbral de la prueba validada. Un método práctico implica la tinción por parejas de la LDT conceptual y de la prueba diagnóstica de compendio en aproximadamente 20 a 40 muestras clínicas consecutivas (Thunnissen, 2019b). Si ninguna de las pruebas presenta una desviación demasiado grande, aproximadamente el 80 % al 90 % de las muestras serán concordantes a lo largo de toda la lámina. Las dos o tres muestras que exhiben una discordancia al menos focal (incluidas las diferencias focales en intensidad) se pueden utilizar para una titulación adicional de la LDT; por ejemplo, aumentando o reduciendo la concentración de anticuerpos primarios. De este modo, la nueva prueba para PD-L1 debería ser positiva a la misma intensidad que la prueba validada clínicamente (prueba comparadora). Este procedimiento se podría llamar *validación clínica indirecta de las pruebas predictivas*.

Si la desviación entre ambas pruebas para el PD-L1 es mayor, usualmente la LDT conceptual se tiñe con menos intensidad o no se tiñe, en comparación con la prueba comercial. Se dispone de más muestras discordantes para mejorar aún más la LDT conceptual, y se consideran adaptaciones más rigurosas, como la modificación de los pasos de recuperación del epítipo y/o el realce de la señal en el método de IHQ. Para facilitar este proceso, es útil un manejo cuidadoso del tejido (Bubendorf et al., 2017), por ejemplo, realizar el corte anticipado de varias secciones de reserva para pruebas adicionales del PD-L1. Posteriormente, se puede llevar a cabo cualquier prueba repetida en muestras adecuadas en unos pocos días o semanas luego del corte inicial.

De hecho, en este proceso de selección de muestras críticas, se aprovecha la heterogeneidad del PD-L1: algunas de las células tumorales pueden ser negativas y otras, no muy lejanas entre sí, pueden

ser positivas en el mismo corte. De forma similar, algunas células tumorales pueden presentar la expresión de PD-L1 con mayor intensidad, mientras que otras se pueden teñir con menos claridad.

Las muestras con una concentración elevada de epítipo alcanzan el nivel máximo de tinción (+++) y es probable que sean positivas en comparación con la mayoría de las demás pruebas para el PD-L1 (Fitzgibbons et al., 2014). La noción de que una muestra como esta es menos útil para la detección de la variación en la práctica cotidiana también puede ser cierta en el caso de una alta concentración del epítipo en la placenta como control positivo externo (Dodson et al., 2019), si bien la placenta es el control positivo recomendado en al menos una prueba aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (prospecto de la prueba *VENTANA PD-L1 [SP263]*). Para la validación de una prueba de IHQ, el uso exclusivo de muestras con una concentración elevada de epítipo puede proporcionar un falso sentido de seguridad. Las muestras que utilizarán como controles se deben adaptar al propósito de la prueba (Cheung et al., 2017a).

Las muestras con una concentración muy baja de epítipo serán negativas en cualquier prueba para PD-L1. Como tales, los casos con concentraciones altas, muy bajas o sin concentraciones de epítipo no son informativos para la comparación del rendimiento de la prueba para PD-L1. La probabilidad *a priori* para una concordancia del 90 % entre dos pruebas será elevada si se examina el 50 % de las muestras negativas para PD-L1 y el 40 % de las muestras claramente positivas para PD-L1. De manera similar, el valor kappa para esta comparación de dos pruebas de IHQ será muy elevado (>0,8) en comparación con los valores kappa en los estudios de patología quirúrgica diagnóstica (0,6 a 0,7). Por lo tanto, este tipo de selección de caso llevará a la concordancia de la mayoría de las pruebas, pero aún es necesario verificarlo con un rango de muestras más amplio.

Previamente, para la validación de una prueba analítica se describieron “controles críticos de rendimiento de prueba de inmunohistoquímica (immunohistochemistry critical assay performance controls, ICAPC)” (Torlakovic et al., 2015) como parte de una serie de 4 estudios que cubrían varios aspectos del contexto de la IHQ diagnóstica (Cheung et al., 2017a, 2017b; Torlakovic et al., 2015, 2017). La diferencia entre los ICAPC y las muestras “críticas” es que estas últimas tienen umbrales asociados con una respuesta clínica. Si bien esto podría ser cierto (no intencionadamente) para algunos ICAPC, probablemente no lo sea para todos los ICAPC. Además, se pueden detectar muestras críticas en una pequeña serie (~ n = 20 a 40) de casos de CPNM en la mayoría de los laboratorios, mientras que los ICAPC, como los xenoinjertos, no siempre son fáciles de obtener para cada laboratorio. La terminología de la validación clínica indirecta de la prueba predictiva es más apropiada para la validación de la IHQ predictiva que el término antiguo *validación diagnóstica*, no solo debido a la asociación con el tratamiento clínico, sino también para la discusión con la administración del hospital: la prueba predictiva dentro de cada categoría diagnóstica es un “complemento” de las pruebas diagnósticas (que requiere de presupuesto adicional para diagnósticos) con el fin de brindar asesoramiento sobre opciones de tratamiento esencialmente diferentes.

Aseguramiento de calidad

Además de las medidas internas de aseguramiento de calidad ya analizadas, es esencial contar con medidas externas de aseguramiento de la calidad para garantizar el rendimiento adecuado de la IHQ. El propósito de la evaluación de calidad externa (external quality assessment, EQA) es establecer, con el soporte de una organización independiente (proveedor de la EQA), el rendimiento de una prueba diagnóstica o predictiva. Básicamente, el proveedor de la EQA distribuye muestras de prueba en diferentes laboratorios y evalúa los resultados de las pruebas, por ejemplo, verdadero positivo, falso positivo, verdadero negativo y falso negativo. Para tener éxito, el laboratorio necesita alcanzar un cierto número de resultados correctos de las pruebas (van Krieken et al., 2013).

En ciertos países, los laboratorios están en la obligación de participar y lograr un desempeño a un nivel aceptable. La participación en la EQA tiene la ventaja de que permite obtener una validación independiente de la prueba. En ocasiones, puede pasar desapercibido un lento deterioro de la prueba de IHQ, en especial si se carece de una muestra de prueba óptima (es decir, una muestra débilmente positiva [+] estable). En dichos casos, este rendimiento inferior se puede detectar al participar en la EQA.

Inicialmente, los proveedores de la EQA predictiva actuaban a una escala local (Thunnissen et al., 2011; Normanno et al., 2011, 2013; Scheel et al., 2016). Por más de una década, la Sociedad Europea de Patología también ha realizado la EQA a nivel multinacional (Tembuysen et al., 2014; Keppens et al., 2018), al igual que el U.K. *National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS) (Ibrahim et al., 2016; Dodson et al., 2019), NordiQC (Vyberg y Nielsen, 2016) CAP y otros (Patton et al., 2014). En las rondas iniciales de la EQA, es posible que las pruebas LDT tengan puntuaciones más bajas. Sin embargo, luego de un periodo de aprendizaje, las LDT pueden tener un rendimiento equivalente al de las pruebas aprobadas por la FDA en las rondas posteriores de EQA (Adam et al., 2018).

Conclusiones

La IHQ es una herramienta diagnóstica poderosa, y los protocolos para la detección de antígenos, los cuales son relevantes para la clasificación tumoral patológica y el órgano de origen, son sólidos. No obstante, la técnica básica es más cualitativa que cuantitativa, pero se puede lograr una evaluación semicuantitativa a través de una elaboración y validación cuidadosas del protocolo. Cada vez se definen mejores métodos de validación que pueden apoyar las LDT tanto en la campo diagnóstico como en el predictivo.

Referencias

- Adam J, Le Stang N, Rouquette I, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(4):953-958.
- Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens. In: Dorfmueller P, Cavazza A, eds. *Pathology for the Clinician*, vol 2. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144):170007.
- Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, et al. Evolution of quality assurance for clinical immunohistochemistry in the era of precision medicine: part 1: fit-for-purpose approach to classification of clinical immunohistochemistry biomarkers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(1):4-11. (a)
- Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, et al. Evolution of quality assurance for clinical immunohistochemistry in the era of precision medicine: part 4: tissue tools for quality assurance in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(4):227-230. (b)
- Dodson A, Parry S, Lissenberg-Witte B, et al. External quality assessment demonstrates that PD-L1 22C3 and SP263 assays are systematically different. *J Pathol Clin Res.* Publicado en línea el 17 de diciembre del 2019. doi:10.1002/cjp2.153
- Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):537-543.
- Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11):1432-1443.
- Garrett PE, Lasky FD, Meier KL. *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline.* 2.^a ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008.
- Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods.* 2014;70(1):12-19.
- Ibrahim M, Parry S, Wilkinson D, et al. ALK immunohistochemistry in NSCLC: discordant staining can impact patient treatment regimen. *J Thorac Oncol.* 2016;11(12):2241-2247.
- Keppens C, Tack V, Hart N, et al. A stitch in time saves nine: external quality assessment rounds demonstrate improved quality of biomarker analysis in lung cancer. *Oncotarget.* 2018;9(29):20524-20538.

- Normanno N, Pinto C, Castiglione F, et al. KRAS mutations testing in colorectal carcinoma patients in Italy: from guidelines to external quality assessment. *PLoS One*. 2011;6(12):e2916.
- Normanno N, Pinto C, Taddei G, et al. Results of the first Italian external quality assurance scheme for somatic EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2013;8(6):773-778.
- Patton S, Normanno N, Blackhall F, et al. Assessing standardization of molecular testing for non-small-cell lung cancer: results of a worldwide external quality assessment (EQA) scheme for EGFR mutation testing. *Br J Cancer*. 2014;111(2):413-420.
- Prinsen CF, Klaassen CH, Thunnissen FB. Microarray as a model for quantitative visualization chemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11(2):168-173.
- Radonic T, Dickhoff C, Mino-Kenudson M, et al. Gross handling of pulmonary resection specimen: maintaining the 3-dimensional orientation. *J Thorac Dis*. 2019;11(suppl 1):S37-S44.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-1833.
- Rief N, Waschow C, Nastainczyk W, et al. Production and characterization of a rabbit monoclonal antibody against human CDC25C phosphatase. *Hybridoma*. 1998;17(4):389-394.
- Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development and standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch*. 2010;457(3):299-307.
- Ruschoff J, Kerr KM, Grote HJ, et al. Reproducibility of immunohistochemical scoring for epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer: round robin test. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1255-1261.
- Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(1):1-5.
- Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2016;29(10):1165-1172.
- Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako; 2013.
- Tembuyser L, Tack V, Zwaenepoel K, et al. The relevance of external quality assessment for molecular testing for ALK positive non-small cell lung cancer: results from two pilot rounds show room for optimization. *PLoS One*. 2014;9(11):e112159.
- Thunnissen E. How to validate predictive immunohistochemistry testing in pathology? A practical approach exploiting the heterogeneity of programmed death ligand-1 present in non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(1):11-21. (a)
- Thunnissen E. In Reply. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(8):909-910. (b)
- Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al. Immunohistochemistry of pulmonary biomarkers: a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):408-419.
- Thunnissen E, Bovee JV, Bruinsma H, et al. EGFR and KRAS quality assurance schemes in pathology: generating normative data for molecular predictive marker analysis in targeted therapy. *J Clin Pathol*. 2011;64(10):884-892.
- Torlakovic EE, Cheung CC, D'Arrigo C, et al. Evolution of quality assurance for clinical immunohistochemistry in the era of precision medicine. Part 3: technical validation of immunohistochemistry (IHC) assays in clinical IHC laboratories. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(3):151-159.
- Torlakovic EE, Nielsen S, Francis G, et al. Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(1):1-18.
- Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, et al, eds. *IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer*. IASLC; 2017.
- van Krieken JH, Normanno N, Blackhall F, et al. Guideline on the requirements of external quality assessment programs in molecular pathology. *Virchows Arch*. 2013;462(1):27-37.
- van Seijen M, Brcic L, Gonzales AN, et al. Impact of delayed and prolonged fixation on the evaluation of immunohistochemical staining on lung carcinoma resection specimen. *Virchows Arch*. 2019;475(2):191-199.
- Vyberg M, Nielsen S. Proficiency testing in immunohistochemistry—experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC). *Virchows Arch*. 2016;468(1):19-29.
- Weber J, Peng H, Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. *Exp Mol Med*. 2017;49(3):e305.
- Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, et al. An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators. *J Thorac Oncol*. 2014;9(5):631-638.

Técnicas y tecnologías en inmunohistoquímica

4

Por David M. Hwang, Kurt A. Schalper y Sanja Dacic

Introducción

En las últimas décadas se han visto avances significativos en las técnicas de inmunohistoquímica y en las tecnologías para automatizar y mejorar la información obtenida mediante tinción inmunohistoquímica. En este capítulo se analizan los sistemas de detección y amplificación, los sistemas de tinción automatizados, las aplicaciones de imagenología digital y morfometría, y las tecnologías emergentes en inmunohistoquímica.

Principios básicos de la inmunohistoquímica

La unión antígeno-anticuerpo se puede detectar con etiquetas fluorescentes (es decir, con inmunofluorescencia) o con sustratos cromogénicos. Debido a que la gran mayoría de las tinciones inmunohistoquímicas clínicas en oncología torácica utilizan etiquetas cromogénicas en vez de fluorescentes, este capítulo se centra en las técnicas cromogénicas.

Las iteraciones iniciales de la inmunohistoquímica normalmente usaban anticuerpos conjugados para enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP) o la fosfatasa ácida (o alcalina) (AP) (Nakane y Pierce, 1966, 1967), lo que permite la deposición enzimática de un cromógeno en los sitios de unión de los anticuerpos. Aunque en la actualidad existen múltiples sustratos cromogénicos, los de uso más común son la 3,3'-diaminobencidina (DAB), la cual produce depósitos de color marrón con la HRP; y el 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), que produce depósitos rojos.

La detección se puede realizar mediante métodos directos o indirectos. En la detección directa, se marca el anticuerpo primario en función del antígeno para ser detectado ([figura 4-1A](#)). Sin embargo, puesto que la detección directa es de sensibilidad limitada y generalmente solo se aplica a proteínas de alta expresión, las técnicas de detección indirecta son de uso más frecuente en las aplicaciones clínicas. En los métodos indirectos, el anticuerpo primario no está marcado, mientras que se marca un anticuerpo secundario dirigido a la especie en la que se generó el anticuerpo primario para ser detectado ([figura 4-1B](#)). Varias moléculas de anticuerpo secundario se pueden unir a una sola molécula de anticuerpo primario, lo que permite cierto grado de amplificación de la señal y un aumento en la sensibilidad de detección. El uso de métodos indirectos también permite detectar muchos antígenos diferentes al utilizar un pequeño número de anticuerpos secundarios dirigidos a una especie (por ejemplo, antirrátón, anticonejo), sin necesidad de marcar cada anticuerpo primario

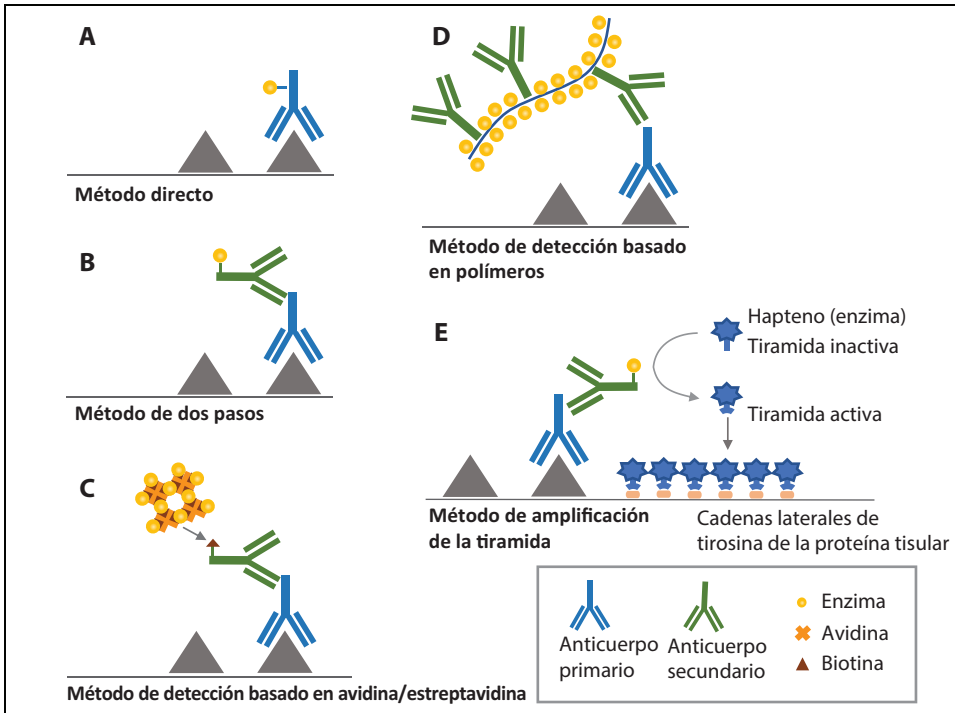


Figura 4-1. Diversos métodos de detección inmunohistoquímica. **(A)** Método directo, con uso de anticuerpo primario conjugado con enzima. **(B)** Método de dos pasos, con uso de anticuerpo secundario marcado con hapteno, que es específico para el anticuerpo primario. **(C)** Método de detección basado en avidina/estreptavidina, con uso de un anticuerpo secundario biotinilado para enlazar el anticuerpo primario a un complejo grande de avidina, estreptavidina y enzima. **(D)** Método de detección basado en polímero, mediante un anticuerpo secundario conjugado con polímero. **(E)** Método de amplificación con tiramida, el cual usa una deposición de tiramida biotinilada con cadenas laterales de tirosina tisular que se activa mediante la formación de radical libre con peroxidasa marcada con anticuerpo.

ni posibles efectos negativos sobre la unión del antígeno como resultado del marcado de los anticuerpos primarios.

También se han desarrollado varias estrategias para aumentar aún más la sensibilidad a través de una amplificación adicional de la señal, entre las que se encuentran las siguientes.

Complejos enzimáticos de detección de avidina/estreptavidina-biotina

Los métodos del complejo avidina-biotina (ABC) y de estreptavidina-biotina marcada (LSAB) se incluyen en estos complejos ([figura 4-1C](#)). En ambos métodos, después de la unión de un anticuerpo secundario biotinilado al anticuerpo primario, se adiciona la enzima de detección biotinilada (por ejemplo, HRP, AP) en complejo con avidina (método ABC) o la enzima de detección conjugada con estreptavidina (método LSAB), lo que incrementa en gran medida la cantidad de moléculas de enzima de detección y la deposición del cromógeno en los sitios de unión del antígeno. Una de las limitaciones de estos métodos es la unión de la avidina o de la estreptavidina a moléculas endógenas similares a la biotina o a la lectina dentro del tejido, lo que podría producir una mayor tinción de fondo no específica.

Complejos de detección de polímeros y otros complejos de detección no basados en biotina

Se desarrollaron varios métodos de detección no basados en biotina para superar algunos de los problemas relacionados con los métodos basados en biotina ([figura 4-1D](#)). Los métodos basados en polímeros, en los que múltiples moléculas de anticuerpos secundarios y de enzimas de detección se

unen a una estructura de polímero de dextrano, forman la base de los kits de detección de amplio uso, incluyendo el kit EnVision (*Agilent Dako*) y el kit de detección *ultraView* Universal DAB (*Roche Tissue Diagnostics*). Puesto que el gran tamaño de los complejos poliméricos puede inhibir la penetración tisular, algunos protocolos usan un segundo anticuerpo (vinculador) entre el anticuerpo primario y el polímero para mejorar la sensibilidad; es un método usado en la prueba *Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx*.

El sistema de detección OptiView (*Roche Tissue Diagnostics*) utiliza un método diferente, no basado en biotina, en donde los anticuerpos secundarios se marcan con múltiples moléculas de un hapteno no endógeno (3-hidroxi-2-quinoxalina [HQ]), seguido por la detección usando anticuerpos anti-HQ conjugados con HRP (Nitta et al., 2013).

Métodos de amplificación catalizada de señal

En los métodos de amplificación catalizada de señal (CSA), la enzima HRP usada convencionalmente para generar el cromógeno se utiliza primero para catalizar otra reacción química que deposita más sitios de unión para el reclutamiento de moléculas adicionales de enzima ([figura 4-1E](#)). Por ejemplo, en presencia de peróxido de hidrógeno, la HRP oxida la tiramida biotinilada, la cual genera una especie de radical libre que reacciona con el tejido circundante y produce la deposición de biotina. Esta biotina depositada se usa para reclutar moléculas adicionales de enzima de detección mediante la adición de complejos de avidina o estreptavidina-biotina-enzima, lo que permite amplificar la señal unas 1000 veces en comparación con el método ABC convencional antes descrito (Ramos-Vara, 2017). El sistema de amplificación OptiView (*Roche Tissue Diagnostics*) utiliza una variación de esta estrategia, en donde la HQ-tiramida se sustituye con tiramida biotinilada; este sistema, junto con el sistema de detección OptiView, se usa en la prueba *VENTANA ALK (D5F3) CDx* (Nitta et al., 2013).

Sistemas de tinción automatizados de inmunohistoquímica

Cuando se realiza manualmente, la inmunohistoquímica es un proceso exigente en términos de tiempo y trabajo, con hasta 100 interacciones manuales necesarias en cada portaobjetos teñido, cada uno con probabilidades de variabilidad y error. La automatización de la mayoría o de todos estos pasos reduce los costos al disminuir de manera significativa el tiempo que los técnicos requieren para la tinción, a la vez que mejora la calidad, al garantizar una mayor consistencia intra e interindividual.

Desde el reporte de la primera estación de trabajo robótica para la tinción inmunocitoquímica a finales de la década de los ochenta (Brigati et al., 1988), los sistemas de tinción automatizados de inmunohistoquímica se han adoptado ampliamente para ser usados en laboratorios clínicos. Actualmente se dispone de múltiples plataformas, cada una con sus propias ventajas y desventajas, sin que haya un sistema de tinción automatizado que sea el mejor para todas las aplicaciones ([tabla 4-1](#)). Por el contrario, los laboratorios deben elegir el (los) sistema(s) de tinción automatizado(s) que aborde(n) de la mejor manera sus necesidades y requerimientos específicos (Prichard, 2014; Myers, 2008). En este aspecto, los aspectos que se deben considerar podrían incluir los siguientes.

Tamaño

Los sistemas de tinción automatizados tienen diversos tamaños y pueden ser unidades de mesa o de piso, dependiendo del tamaño disponible.

Tabla 4-1. Comparación de las plataformas automatizadas de inmunohistoquímica usadas comúnmente

	De mesa		De piso			
	Agilent Dako	Leica	Agilent Dako	Leica	Roche	Roche
	Autostainer	Bond Max	Omnis	Bond III	BenchMark XT	BenchMark ULTRA
Pasos de tinción automatizada						
Secado del portaobjetos	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Desencerado	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Calentamiento integrado	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Hibridación <i>in situ</i> integrada	No	ADN/ARN	ADN/ARN	ADN/ARN	ADN/ARN	ADN/ARN
Dimensiones						
Tamaño (ancho × profundidad × altura), cm	89 × 66 × 68	76 × 77,5 × 70,3	150 × 80 × 177	79 × 80,6 × 137,8	89 × 66 × 153	112 × 84 × 159
Manejo de portaobjetos						
Capacidad de portaobjetos	48	30	60	30	30	30
Tamaño de lote, portaobjetos	4 × 12	3 × 10	12 × 5	3 × 10	1 × 30	30 × 1
Capacidad de procesamiento/24 h para inmunohistoquímica (IHQ)	144	90	165	90/120	90	90
Reactivos						
Posiciones	42	36	60	36	35	35
Control de temperatura	No	No	Sí	No	No	No
Sistema abierto	Sí	Anticuerpo primario	Anticuerpo primario	Anticuerpo primario	Anticuerpo primario + enzima	Anticuerpo primario + enzima

Adaptado de De Wiest y van Hecke, 2017.

Comparación entre sistemas cerrados y sistemas abiertos

Algunos sistemas de tinción automatizados proporcionan una mayor flexibilidad en cuanto a la elección del reactivo o a los protocolos (sistemas *abiertos*), mientras que otros limitan los tipos o fuentes de reactivos y los protocolos que se pueden usar (sistemas *cerrados*). Mientras que los sistemas abiertos pueden ser de más utilidad en contextos en donde se necesita desarrollar y optimizar nuevos protocolos de tinción para grandes números de marcadores (por ejemplo, contextos de investigación y de diseño), los sistemas cerrados están más orientados hacia la maximización de la reproducibilidad y la minimización del tiempo de trabajo manual por medio de la aplicación de reactivos y protocolos estandarizados.

Rendimiento y tamaños de lote

Por lo general, el rendimiento es una consideración primaria cuando se evalúan plataformas automatizadas, y se considera a menudo como una función de la capacidad en términos de portaobjetos y tiempo de operación. Sin embargo, además del volumen total de portaobjetos procesados, otras consideraciones pueden incluir la cantidad de pruebas y protocolos diferentes que se deben aplicar, ya que plataformas diferentes ofrecen distintos grados de flexibilidad para los tamaños de lote, en los que el protocolo de tinción para todos los portaobjetos en el lote debe ser similar, de modo que se optimicen la capacidad para cargar nuevos portaobjetos para tinción y el tiempo de operación.

Otras funcionalidades

Los diferentes sistemas de tinción automatizados pueden ofrecer otras funcionalidades, por ejemplo, secado del portaobjetos integrado, desparafinización, calentamiento (para obtención de antígeno)

e hibridación *in situ* (ISH). Aunque estas funcionalidades adicionales pueden incrementar la consistencia y reducir el tiempo manual, es posible que aumenten también los tiempos de operación. Se puede encontrar información adicional sobre los sistemas de tinción automatizados en la bibliografía (Prichard, 2014; Myers, 2008).

Imagenología digital y análisis morfométrico

Los avances en la digitalización rápida y precisa de las preparaciones de histología de portaobjetos completos han contribuido a aumentar la importancia de la morfología y la inmunohistoquímica en la práctica de la patología. Los portaobjetos digitales en tinciones con hematoxilina y eosina o de inmunohistoquímica (llamados también *portaobjetos virtuales*) se utilizan actualmente para varios propósitos, entre ellos el diagnóstico primario, la evaluación de biomarcadores, conferencias clínicas, evaluación remota de casos, consultas para segundas opiniones, educación e investigación, y almacenamiento de casos (Pantanowitz et al., 2013; Evans et al., 2018; Liu y Pantanowitz, 2019). Actualmente se dispone de múltiples plataformas de imagenología en portaobjetos digitales a nivel comercial, y algunas han recibido aprobación y/o autorización reguladora para uso clínico (Liu y Pantanowitz, 2019). Esto ha hecho posible una mayor adopción de la patología digital en el ámbito mundial, y algunas instituciones operan exclusivamente con portaobjetos virtuales. La disponibilidad de las muestras digitales también ha impulsado el uso de herramientas informáticas para análisis morfométricos más detallados y la evaluación cuantitativa de las variables. Estos desarrollos han expandido el ámbito de la inmunohistoquímica, pero también han hecho surgir nuevas interrogantes y desafíos.

Inmunohistoquímica digital para diagnóstico primario y evaluación de biomarcadores

El uso de portaobjetos digitales en la clínica está asociado con el panorama regulador que rige el centro o institución respectivo; además, se han observado diferencias en términos de definiciones y requerimientos entre las autoridades en diversas regiones del mundo (Pantanowitz et al., 2013; Evans et al., 2018; Garcia-Rojo et al., 2019; Zhao et al., 2015). Por ejemplo, la patología digital recibió la primera aprobación reguladora de parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2017 para el diagnóstico primario en patología quirúrgica con base en estudios de no inferioridad, en comparación con el diagnóstico microscópico de preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (Evans et al., 2018). El uso de portaobjetos digitales de inmunohistoquímica representa otro posible uso clínico, pero no se considera así para el diagnóstico primario. En general, la inmunohistoquímica se usa para refinar o complementar el diagnóstico mediante la identificación de marcadores de diferenciación, o para detectar biomarcadores predictivos o pronósticos (véase la siguiente subsección “Comparación entre el análisis cualitativo y el análisis cuantitativo”). Por lo tanto, el análisis digital de los portaobjetos de inmunohistoquímica se puede realizar con una plataforma autorizada o no autorizada por la FDA como una prueba desarrollada en laboratorio, siempre y cuando se cumplan los requisitos apropiados de validación de laboratorio y de prueba, además de los requisitos de control de calidad. En los Estados Unidos, las pruebas de inmunohistoquímica digital requieren el cumplimiento de los estándares del *College of American Pathologists* (CAP), los cuales incluyen evaluar la precisión, la exactitud y la reproducibilidad (Evans et al., 2018). Los sistemas de patología digital han recibido la designación diagnóstica *in vitro* (por ejemplo, *Conformité Européenne* [CE]) en la Unión Europea, lo que permite su uso clínico amplio, incluyendo la inmunohistoquímica y el software específico para la evaluación automatizada de los biomarcadores (Garcia-Rojo et al., 2019).

Comparación entre el análisis cualitativo y el análisis cuantitativo

La interpretación de los portaobjetos de inmunohistoquímica suele estar basada en la estimación visual cualitativa o semicuantitativa de la reacción cromogénica bajo microscopía óptica, y se analiza

en el contexto de las características morfológicas. La mayoría de los marcadores de diferenciación, como las queratinas, el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1), y p63/p40 requieren una evaluación binaria relativamente simple (por ejemplo, positiva o negativa). Los biomarcadores predictivos o complementarios, como el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*), el oncogén 1 c-ros (*ROS1*), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*ERBB2*, conocido también como *HER2*), o los receptores de hormonas requieren de una evaluación más compleja que incluya las expresiones de la cantidad y/o la intensidad de la tinción. La naturaleza subjetiva de la evaluación hecha por el patólogo proporciona numerosas ventajas en relación con la simplicidad, la eficiencia y la rentabilidad del análisis. No obstante, la consistencia entre los laboratorios y el consenso entre los patólogos muestra limitaciones.

Las estrategias para superar dichas limitaciones incluyen la creación de pautas estandarizadas de análisis y puntuación por parte de expertos (Lindeman et al., 2018; Wolff et al., 2018; Lantuejoul et al., 2019; Jain et al., 2019; Tsao et al., 2016). Cuando se realiza correctamente, el análisis cuantitativo de imágenes puede generar lecturas de marcadores tisulares precisas y altamente reproducibles (Aeffner et al., 2019). La mayoría de las herramientas avanzadas de análisis de imágenes incluyen algoritmos de extracción y segmentación mediante aprendizaje automático que permiten obtener información localizada con base en áreas específicas de una muestra, células u objetos no celulares. Aunque el logro de una segmentación tisular precisa y de la cuantificación de eventos entre los casos plantea numerosos desafíos, hace algún tiempo se establecieron múltiples algoritmos automatizados de análisis cuantitativo para la puntuación de los portaobjetos digitales de inmunohistoquímica, y las autoridades reguladoras (por ejemplo, FDA) los aprobaron para evaluar biomarcadores en el cáncer de mama (por ejemplo, receptor de estrógeno [ER], receptor de progesterona [PR], *HER2*, y Ki-67). Hasta donde sabemos, no se ha establecido ningún dispositivo o algoritmo automatizado de inmunohistoquímica de grado clínico para la evaluación de biomarcadores en neoplasias malignas torácicas/de vías aéreas. No obstante, en la actualidad se dispone de múltiples aplicaciones de software comerciales y de código abierto para dirigir análisis cuantitativos de biomarcadores tisulares (por ejemplo, Aperio ImageScope, InForm, Halo, QuPath, Cyto-Mine, Orbit, ImageJ/SlideJ, y Visiopharm). En la [figura 4-2](#) se muestran ejemplos de puntuación cuantitativa de PD-L1 en el cáncer de pulmón no microcítico utilizando células tisulares/segmentación tisular y enumeración celular automatizada con dos plataformas comerciales diferentes. En estudios recientes que apoyan la factibilidad de realizar una evaluación automatizada de la inmunohistoquímica para PD-L1 y utilizan instrumentación comercial o software personalizado se observó una concordancia relativamente alta con la puntuación asignada por el patólogo en las muestras de cáncer de pulmón (Taylor et al., 2019; Althammer et al., 2019; Widmaier et al., 2020).

Aprendizaje automático, inteligencia artificial e interpretación de portaobjetos

Las estrategias de aprendizaje automático permiten el análisis de datos complejos de manera iterativa, rápida, objetiva y estadísticamente controlada, así como la identificación de patrones con intervención humana mínima; facilitan la integración de variables con diferentes unidades/dimensiones; e incrementan el valor de los grupos de datos usando estrategias de aumento *in silico* (Esteva et al., 2019; Bera et al., 2019). El aprendizaje automático se puede aplicar a la patología digital para realizar tareas generales, más allá de la segmentación tisular y el conteo de marcadores/células, como la identificación de patrones morfométricos subvisuales, el diagnóstico integrado y la adquisición de pronósticos/resultados predictivos. En concreto, el análisis de aprendizaje profundo mediante redes neurales convolucionales ha mostrado un potencial destacado para el reconocimiento de patrones en representaciones de imágenes, logrando así un rendimiento casi a nivel humano en la clasificación de objetos. En este sentido, recientemente se mostró que un algoritmo de aprendizaje profundo es capaz de predecir de manera precisa el estatus PD-L1 de casos de cáncer de pulmón no microcítico

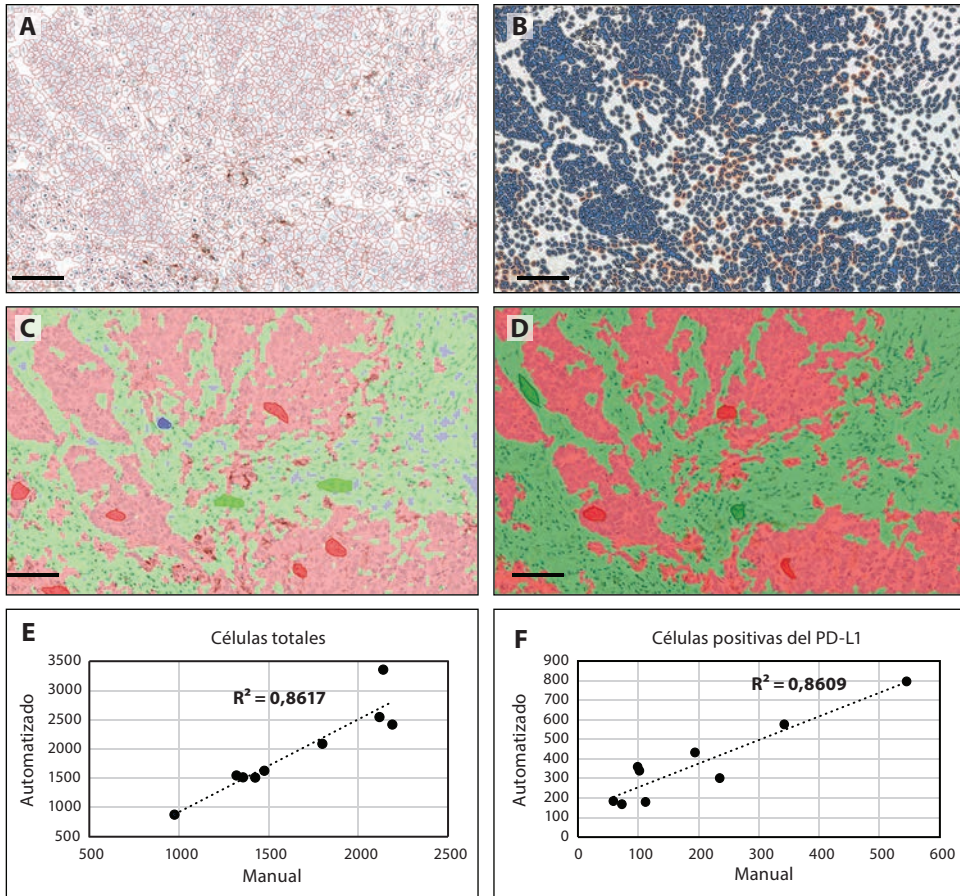


Figura 4-2. Análisis tisular automatizado de cáncer de pulmón no microcítico teñido para ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1). (A-C) Muestras de cáncer de pulmón no microcítico teñidas con PD-L1 (clon E1L3N) y enviadas a (A) segmentación celular automatizada o (C) segmentación tisular con software Inform (*Akoya Biosciences*). (B-D) Muestras de cáncer de pulmón no microcítico teñidas con PD-L1 y enviadas a (B) segmentación celular automatizada (D) o segmentación tisular con software Halo (*Indica Labs*). En C y D, rojo indica el compartimiento tumoral y verde indica el compartimiento estromal. Barra de escala = 300 μ m. (E-F) Diagramas que muestran la correlación de los conteos celulares usando conteo manual o con software de análisis automatizado de imágenes (E) para todas las células señaladas o (F) para las células positivas para PD-L1. R^2 = coeficiente de regresión lineal.

mediante el análisis de preparaciones digitales teñidas con hematoxilina-eosina (Sha et al., 2019). Además, se han usado redes generativas adversarias en la puntuación inmunohistoquímica digital automatizada de PD-L1 en biopsias de aguja gruesa de cáncer de pulmón (Kapil et al., 2018). Están en curso grandes esfuerzos para establecer el diagnóstico automatizado de portaobjetos digitales con base en inteligencia artificial, incluyendo la inmunohistoquímica, y se han fundado múltiples compañías que exploran este concepto (por ejemplo, *PathAI*, *Paige*, *Proscia*, y *SpIntellX*, entre otras).

Tecnologías y plataformas emergentes en inmunohistoquímica

Los desarrollos recientes se han centrado en el incremento del rendimiento de las pruebas inmunohistoquímicas al realizar la tinción/detección simultánea de múltiples dianas. La inmunofluorescencia multiplexada ha surgido como la plataforma dominante debido a que puede superar las limitaciones de rango dinámico de la inmunohistoquímica cromogénica y evitar las dificultades para separar con precisión la señal de diferentes sustratos colorimétricos bajo microscopía óptica

Tabla 4-2. Propiedades de las plataformas de análisis tisular

Plataforma	Inmunohistoquímica	Inmunofluorescencia	Citometría de masas por imágenes
Producción de señal	Absorbancia de luz	Emisión de luz	Corriente de iones de marcado de masa
Muestras FFPE adecuadas	Sí	Sí	Sí
Salida lineal/cuantitativa	No	Sí	Sí
Número óptimo de marcadores	1 a 2	1 a 6	30 a 35
Rango dinámico	1 log	2,5 logs	4 a 5 logs
Resolución máxima	200 nm	200 nm	1 μ m
Rebasamiento de señal	+++	++	+
Amplificación de señal	~300-3000 tags/ab (HRP-TSA)	~300-3000 tags/ab (HRP-TSA)	~160 átomos/ab
Rendimiento de análisis	<0,5 min/mm ² por tejido	0,5 a 1 min/mm ² por tejido	1 a 2 h/mm ² por tejido

Abreviaturas: ab = anticuerpo; FFPE = fijo en formalina y embebido en parafina; HRP = peroxidasa de rábano; TSA = amplificación de señal con tiramida.

([tabla 4-2](#)). Además, la inmunofluorescencia permite la adquisición selectiva de la señal específica del marcador de diferentes canales fluorescentes al usar filtros de paso banda y estrategias de desmezclado espectral que favorecen la medición lineal/cuantitativa de la diana (Carvajal-Hausdorf et al., 2015). Los protocolos multiplexados actuales de inmunofluorescencia cuantitativa permiten la detección simultánea y la cuantificación de señal de hasta 6 a 7 marcadores en diferentes longitudes de onda usando reactivos y/o instrumentos comerciales. Se han usado con éxito plataformas multiplexadas automatizadas de inmunofluorescencia para realizar la medición objetiva y localizada de marcadores tumorales y relacionados con la inmunidad en muestras de cáncer de pulmón fijadas en formalina y embebidas en parafina (Velcheti et al., 2014; Carvajal-Hausdorf et al., 2015; Schalper et al., 2015). Además, los protocolos de inmunofluorescencia multiplexados permiten la identificación simultánea de diferentes analitos, incluyendo proteínas y transcritos de ARN mensajero (ARNm). En este sentido, se ha logrado la detección localizada de marcadores de proteínas tumorales y de transcritos de ARNm de PD-L1 o de interleuquina 8 (IL-8) en tejidos de biopsia de cáncer de pulmón (Velcheti et al., 2014; Sanmamed et al., 2017). En la [figura 4-3](#) se muestran imágenes representativas de paneles de fluorescencia multiplexados que mapean de manera simultánea 5 dianas de proteínas o ARNm de tipo inmune. Recientemente, se adaptó la tecnología de espectrometría de masas para usarla en formato de microscopio a fin de estudiar muestras usando entre 30 y 40 dianas (teóricamente, >150), con una resolución de 1 μ m, de manera cuantitativa (Giesen et al., 2014). Esta tecnología, llamada *citometría de masas por imágenes* ([tabla 4-2](#)), y también denominada *inmunohistoquímica elemental*, utiliza anticuerpos primarios conjugados con elementos de la serie de lantánidos y está disponible comercialmente (*Hyperion, Fluidigm Corporation*). También se ha reportado una tecnología similar que utiliza anticuerpos conjugados con metales, además de ionización basada en haces de iones múltiples (MIBI, IONpath), que está siendo comercializada (Angelo et al., 2014). Se espera que la integración del análisis de alto rendimiento, cuantitativo y con resolución espacial de dianas y las estrategias computacionales avanzadas, mejore perceptiblemente las herramientas del patólogo, así como el diagnóstico y la evaluación de biomarcadores en el futuro cercano.

Conclusiones

Los recientes avances en las técnicas de inmunohistoquímica expanden el rango de detección de la concentración de epítomos (sensibilidad) y de diversas moléculas. Además, los sistemas de tinción automatizados facilitan la tinción confiable, reproducible y de alto rendimiento que tanto se necesita en la práctica clínica. Actualmente están surgiendo diversas tecnologías

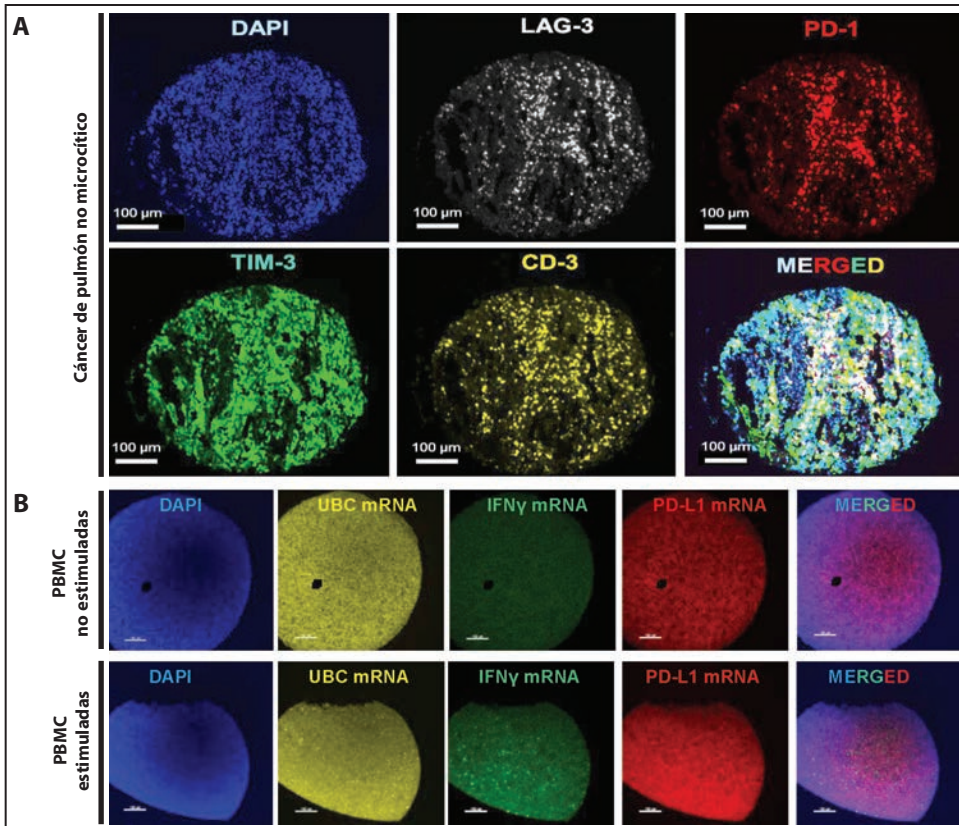


Figura 4-3. Detección simultánea de múltiples dianas de proteína o ARN mensajero (ARNm) usando inmunofluorescencia en el cáncer de pulmón. **(A)** Imágenes de fluorescencia representativas que muestran la expresión de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (todas las células, canal azul), CD3 (células T, canal amarillo), PD-1 (canal rojo), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) (canal blanco) y proteína 3 que contiene dominio de mucina (TIM-3) (canal verde) en cáncer de pulmón no microcítico humano fijado en formalina y embebido en parafina. **(B)** Imágenes de fluorescencia representativa que muestran la expresión de DAPI (todas las células, canal azul), ARN mensajero (ARNm) de ubiquitina C (UBC) (canal amarillo), ARNm de interferón gamma (IFN- γ) (canal verde) y ARNm de PD-L1 (canal rojo) en preparaciones fijadas en formalina y embebidas en parafina de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) o PBMC estimuladas por 4 horas con forbol miristato acetato (PMA) más ionomicina. Barra de escala = 300 μ m.

de imagenología digital, y muchas de ellas muestran resultados prometedores, lo que indica que la inmunohistoquímica se está desarrollando cada vez más.

Referencias

- Aeffner F, Zarella MD, Buchbinder N, et al. Introduction to digital image analysis in whole-slide imaging: a white paper from the Digital Pathology Association. *J Pathol Inform.* 2019;10(1):9.
- Althammer S, Tan TH, Spitzmuller A, et al. Automated image analysis of NSCLC biopsies to predict response to anti-PD-L1 therapy. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):121.
- Angelo M, Bendall SC, Finck R, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med.* 2014;20(4):436-442.
- Bera K, Schalper KA, Rimm DL, et al. Artificial intelligence in digital pathology—new tools for diagnosis and precision oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(11):703-715.
- Brigati DJ, Budgeon LR, Unger ER, et al. Immunocytochemistry is automated: development of a robotic workstation based upon the capillary action principle. *J Histotechnol.* 1988;11(3):165-183.
- Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Neurmeister VM, et al. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab Invest.* 2015;95(4):385-396.

- De Wiest B, van Hecke D. IHC stainer platforms: overview, pros and cons. NordiQC database. 2017. Accessed January 31, 2020. <https://www.nordiqc.org/downloads/documents/81.pdf>
- Esteva A, Robicquet A, Ramsundar B, et al. A guide to deep learning in healthcare. *Nat Med*. 2019;25(1):24-29.
- Evans AJ, Bauer TW, Bui MM, et al. US Food and Drug Administration approval of whole slide imaging for primary diagnosis: a key milestone is reached and new questions are raised. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1383-1387.
- Garcia-Rojo M, De Mena D, Muriel Cueto P, et al. New European Union regulations related to whole slide image scanners and image analysis software. *J Pathol Inform*. 2019;10:2.
- Giesen C, Wang HA, Schapiro D, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods*. 2014;11(4):417-422.
- Jain D, Nabirajan A, Borczuk A, et al. Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(5):325-339.
- Kapil A, Meier A, Zuraw A, et al. Deep semi supervised generative learning for automated tumor proportion scoring on NSCLC tissue needle biopsies. *Sci Rep*. 2018;8(1):17343.
- Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, et al. PD-L1 testing for lung cancer in 2019: perspective from the IASLC pathology committee. *J Thorac Oncol*. 2019;S1556-0864(19)33847-X.
- Lindeman NI, Cagel PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346.
- Liu Y, Pantanowitz L. Digital pathology: review of current opportunities and challenges for oral pathologists. *J Oral Pathol Med*. 2019;48(4):263-269.
- Myers J. A review of automated slide stainers for immunohistochemistry and in situ hybridization. *Med Lab Obs*. 2008;40(1):41-44.
- Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol*. 1967;33(2):307-318.
- Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*. 1966;14(12):929-931.
- Nitta H, Tsuta K, Yoshida A, et al. New methods for ALK status diagnosis in non-small-cell lung cancer: an improved ALK immunohistochemical assay and a new, brightfield, dual ALK IHC-in situ hybridization assay. *J Thorac Oncol*. 2013;8(8):1019-1031.
- Pantanowitz L, Sinard JH, Hendricks WH, et al. Validating whole slide imaging for diagnostic purposes in pathology: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(12):1710-1712.
- Prichard JW. Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(12):1578-1582.
- Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2017;1641:115-128.
- Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1988-1995.
- Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3):dju435.
- Sha L, Osinski BL, Ho IY, et al. Multi-field-of-view deep learning model predicts nonsmall cell lung cancer programmed death-ligand 1 status from whole-slide hematoxylin and eosin images. *J Pathol Inform*. 2019;10:24.
- Taylor CR, Jadhav AP, Gholap A, et al. A multi-institutional study to evaluate automated whole slide scoring of immunohistochemistry for assessment of programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(4):263-269.
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, eds. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. 2.^a ed. IASLC; 2016.
- Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2014;94(1):107-116.
- Widmaier M, Wiestler T, Walker J, et al. Comparison of continuous measures across diagnostic PD-L1 assays in non-small cell lung cancer using automated image analysis. *Mod Pathol*. 2020;33(3):380-390.
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382.
- Zhao C, Wu T, Ding X, et al. International telepathology consultation: three years of experience between the University of Pittsburgh Medical Center and KingMed Diagnostics in China. *J Pathol Inform*. 2015;6:63.

Inmunohistoquímica en muestras pequeñas

5

Por Lynette M. Sholl y Claudia Poleri

Introducción

Se estima que el 70 % de los cánceres de pulmón primarios se diagnostican y estadifican usando biopsias y/o muestras pequeñas de citología. Los abordajes técnicos para la adquisición de tejido tumoral en el pulmón incluyen la biopsia transtorácica por aguja y/o la aspiración con aguja fina (FNA), la biopsia y/o FNA endobronquial o transbronquial, así como la aspiración de líquido pleural en el contexto de derrames malignos (Ofiara et al., 2012). En el capítulo 12 se analizan en mayor detalle los principios específicos para las muestras de citología. Como se acaba de describir, las biopsias pequeñas se derivan de procedimientos mínimamente invasivos que se asocian con la reducción de la incomodidad y del riesgo para el paciente en relación con las biopsias quirúrgicas. Sin embargo, las biopsias pequeñas plantean varios desafíos potenciales para lograr un diagnóstico óptimo y realizar pruebas de biomarcadores posteriores. En primer lugar, el tamaño pequeño de estas muestras puede aumentar los desafíos debido a la cantidad insuficiente de células tumorales evaluables y a la cantidad de ácido nucleico para pruebas moleculares posteriores. En segundo lugar, las biopsias pulmonares de sitio primario pueden estar contaminadas sustancialmente con células benignas, como las del parénquima pulmonar normal, el epitelio bronquial o el tejido pleural, lo que tiene implicaciones tanto para el diagnóstico como para la sensibilidad de las pruebas moleculares. En tercer lugar, las biopsias pequeñas a menudo sufren de artefacto de estiramiento y de distorsión tisular como una función del procedimiento utilizado para obtener el tejido. Finalmente, estas muestras representan solo una pequeña fracción del tumor general y es posible que no capturen la extensión de la heterogeneidad tumoral. Este capítulo se centra en los métodos de manipulación de biopsias pequeñas, con énfasis en el papel de la inmunohistoquímica (IHQ) para el diagnóstico, la predicción terapéutica y las sugerencias para optimizar esta herramienta en la práctica.

¿Se debe realizar inmunohistoquímica (IHQ) en todas las biopsias pequeñas?

Debido a la naturaleza esencial del perfil molecular para seleccionar pacientes con carcinoma no microcítico (CNM) en estadio avanzado para terapia dirigida, los patólogos deben ser conscientes de la necesidad de preservar el tejido tumoral para pruebas de biomarcadores mientras se genera el diagnóstico más preciso y específico posible. Las estrategias diagnósticas propuestas originalmente en 2011 han formado la base de la nomenclatura actual (Travis et al., 2011, 2013, 2015) y enfatizan el uso prudente de la IHQ en pacientes con sospecha de CNM ([Figura 5-1](#)).

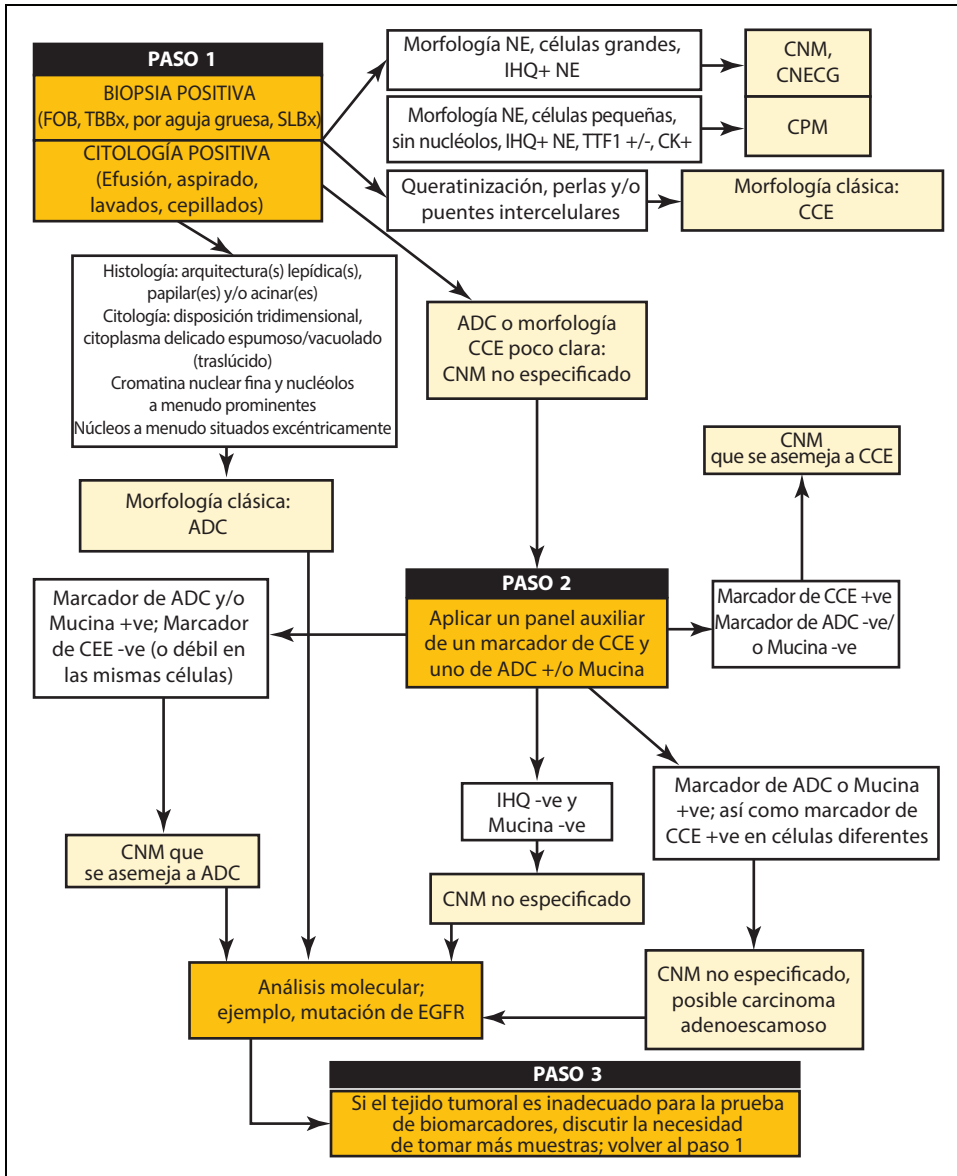


Figura 5-1. Algoritmo para los estudios de biopsias pequeñas y/o muestras de citología con cáncer de pulmón. No se debe realizar inmunohistoquímica (IHQ) en las muestras con la morfología clásica de adenocarcinoma o de carcinoma de células escamosas. Si hay una morfología neuroendocrina, el tumor se puede clasificar de acuerdo con los criterios estándar. Se debe realizar la IHQ en los casos sin una morfología clara de adenocarcinoma, carcinoma escamoso o neuroendocrino (NE). ADC = adenocarcinoma; CK = citoqueratina; EGFR = receptor del factor de crecimiento epidérmico; FOB = broncoscopia flexible de fibra óptica; CNECG = carcinoma neuroendocrino de células grandes; NOS = no especificado; CNM = carcinoma no microcítico; CPM = carcinoma de pulmón microcítico; SLBx = biopsia pulmonar quirúrgica; CCE = carcinoma de células escamosas; TBBx = biopsia transbronquial; TTF1 = factor de transcripción tiroideo 1. (Adaptado de Travis et al., 2011)

Resumen de respuesta

En resumen, la impresión morfológica del patólogo debe guiar el enfoque diagnóstico inicial: si la biopsia muestra una diferenciación morfológica clara de un carcinoma de células escamosas (es decir, queratinización) o de un adenocarcinoma (es decir, formación glandular), se aconseja al patólogo emitir el diagnóstico correspondiente, y no es obligatorio aplicar la IHQ

que lo confirme. Claramente, esto implica que el contexto clínico justifica un diagnóstico de cáncer de pulmón primario y que se consideraron los imitadores potenciales (enfermedad metastásica, mesotelioma) cuando fue apropiado.

¿Cuándo se debe realizar IHQ para clasificar el CNM?

Puede ser difícil emitir un diagnóstico morfológico confiable en una biopsia con carcinoma poco diferenciado (sin evidencia morfológica de adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas). En este contexto, asumiendo como mínimo que se ha excluido morfológicamente un carcinoma microcítico, el diagnóstico que podría emitir el patólogo es el de CNM no especificado (NOS). En este punto, se debe utilizar la IHQ para aclarar si es más probable que el tejido represente adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas (u otro). El uso de la IHQ en esta situación se asocia con una reducción sustancial en la frecuencia de un diagnóstico de CNM-NOS (Loo et al., 2010; Nicholson et al., 2010; Mukhopadhyay y Katzenstein, 2011; Zhao et al., 2014) y permite que el médico tratante tenga más confianza en la elección de la terapia y/o en la solicitud de pruebas de biomarcadores predictivos.

Resumen de respuesta

La IHQ se debe realizar en el carcinoma poco diferenciado (a menudo con un patrón de crecimiento sólido). Este patrón se puede observar en los adenocarcinomas y en el carcinoma de células escamosas no queratinizante.

¿Cuáles son los mejores marcadores iniciales para clasificar el CNM?

Los razonamientos para la selección de ciertos anticuerpos y clones se abordan con más detalle en otra sección de este atlas. En resumen, el panel IHQ de primera línea óptimo para el diagnóstico de CNM incluye solo el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y p40 (Travis et al., 2013; Yatabe et al., 2019). En la [tabla 5-1](#) se proporciona una guía para la interpretación de estas tinciones con base en la extensión de la positividad. En las [figuras 5-2](#) y [5-3](#) se muestran ejemplos de tumores morfológicamente no diferenciados caracterizados mediante IHQ.

Resumen de respuesta

La combinación de p40 y TTF1 tiene la mejor sensibilidad y especificidad para separar el CNM en adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas.

¿Qué otros marcadores tumorales pueden ser útiles en la clasificación del CNM?

La napsina A es relativamente comparable al TTF1 en la identificación del adenocarcinoma (Tran et al., 2016), y como marcador citoplasmático, se puede multiplexar con la tinción nuclear para p40 de tal forma que solo se requiera un portaobjetos para el análisis IHQ

Tabla 5-1. Panel inmunohistoquímico diagnóstico inicial para el carcinoma no microcítico (CNM) en biopsias o muestras pequeñas de citología

TTF1	p40	Diagnóstico	Comentarios
+ ^a a +++	- o +	CNM que se asemeja a adenocarcinoma	Cuando hay tinción de la misma población celular
-	+ en >50 %	CNM que se asemeja a carcinoma de células escamosas	
-	+ en 10 % al <50 %	CNM, NOS	
+ ^a a ++	Cualquier extensión	CNM, NOS, posible carcinoma adenoescamoso	Cuando hay tinción de poblaciones celulares separadas

Abreviaturas: NOS = no especificado; TTF1 = factor de transcripción tiroideo 1.

^aTinción focal de célula tumoral.

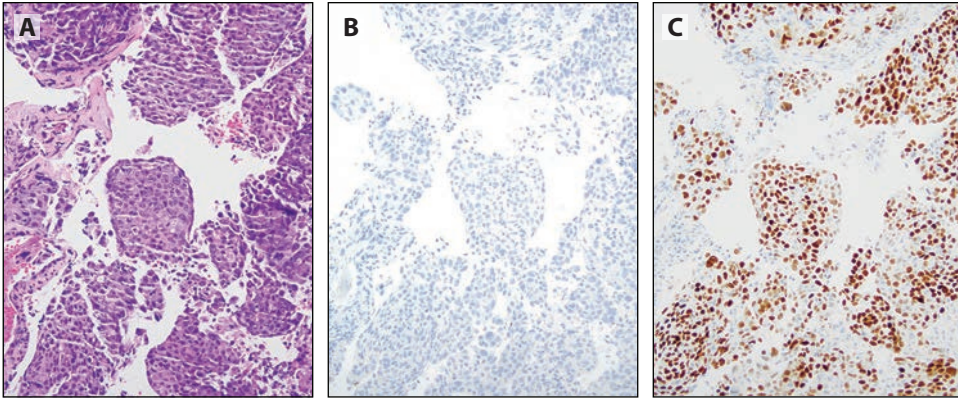


Figura 5-2. Carcinoma no microcítico (CNM) que se asemeja a adenocarcinoma. **(A)** Nótese un carcinoma poco diferenciado con un patrón de crecimiento sólido y sin pruebas morfológicas de diferenciación glandular, escamosa o neuroendocrina en los cortes de rutina teñidos con H&E. Las células del carcinoma son **(B)** negativas para p40 y **(C)** difusamente positivas para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1).

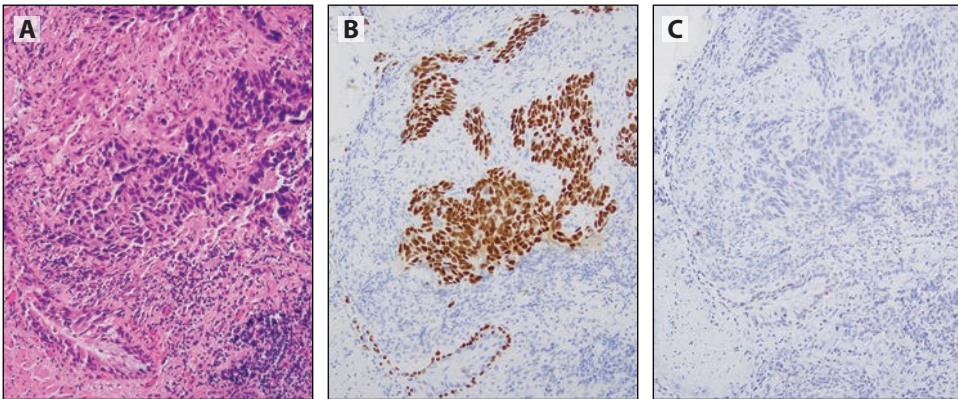


Figura 5-3. Carcinoma no microcítico (CNM) que se asemeja a carcinoma de células escamosas. **(A)** Nótese un carcinoma poco diferenciado con un patrón de crecimiento sólido y necrosis extensa en los cortes de rutina teñidos con H&E. Las células del carcinoma son **(B)** difusamente positivas para p40 y **(C)** negativas para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1).

(Nishino et al., 2016). Sin embargo, debido a los desafíos en la interpretación de la tinción para napsina A, por lo general no se recomienda para uso de primera línea (Yatabe et al., 2019). Si las tinciones para TTF1 y p40 no son informativas o son confusas, un panel limitado de marcadores IHQ de segunda línea que incluya napsina A y citoqueratina 5/6 (CK5/6) puede ayudar ocasionalmente para fundamentar el diagnóstico (Travis et al., 2015). La citoqueratina 7 es un discriminador insuficiente de adenocarcinoma y de carcinoma escamoso de pulmón. No se recomienda para este propósito (Yatabe et al., 2019). Se deben considerar estudios moleculares para el CNM-NOS, puesto que no se puede descartar el diagnóstico de adenocarcinoma. Se debe añadir una tinción de panqueratina a un CNM-NOS de tipo nulo que no muestra tinción para TTF1 o p40.

Resumen de respuesta

La napsina A y CK5/6 pueden mejorar la clasificación en algunos CNM-NOS. Se debe agregar una panqueratina en caso de un carcinoma poco diferenciado que sea negativo para TTF1, p40, CK5/6 y napsina A.

¿Cuáles son los mejores marcadores para las neoplasias neuroendocrinas?

Los tumores neuroendocrinos, en particular los tumores de la familia carcinoide y el carcinoma microcítico, comúnmente se originan en las vías respiratorias centrales y se pueden analizar por métodos como biopsia endobronquial o transbronquial. Las células tumorales son delicadas y propensas al artefacto de estiramiento durante el proceso de muestreo. Además, la morfología del carcinoma microcítico, el carcinoide, las estructuras benignas (como el tejido linfoide) y otros tumores de células pequeñas, redondas y azules (carcinoma escamoso basaloides, linfoma, sarcomas) puede mostrar una superposición sustancial. Como resultado, la IHQ a menudo es esencial para lograr un diagnóstico confiable cuando se presenta con este diagnóstico diferencial. Los marcadores relevantes se abordan con más detalle posteriormente en este atlas. En esta sección se presentan algunas consideraciones básicas.

Si las células se asemejan a linfocitos y se sospecha un tejido linfoide asociado a bronquio (BALT), la tinción con antígeno leucocitario común solo es suficiente para confirmar este diagnóstico ([figura 5-4](#)). El tejido BALT es común en los pulmones de los adultos y puede ser prominente en los puntos de ramificación de las vías respiratorias (Churg et al., 2005).

Se puede usar una tinción para queratina a fin de confirmar el diagnóstico de una neoplasia epitelial; no obstante, en pocas oportunidades, los carcinomas microcíticos pueden ser negativos o ser muy focalmente positivos. Se pueden usar tinciones para marcadores neuroendocrinos que incluyen sinaptofisina, cromogranina, CD56 y/o proteína 1 asociada al insulinoma (INSM1) para confirmar la diferenciación neuroendocrina, pero estas son negativas hasta en el 10 % de los casos (Travis et al., 2015) ([Figura 5-5](#)).

Los tumores carcinoides carecen de las características evidentes de malignidad (atipia, mitosis frecuentes, necrosis laminar) típicas del carcinoma microcítico. En muestras limitadas y mal preservadas, podría ser necesaria la IHQ para Ki-67 a fin de confirmar una tasa de proliferación baja en los tumores carcinoides, o una tasa muy alta en los carcinomas microcíticos (véase el capítulo 10 para conocer información sobre los marcadores neuroendocrinos).

En el diagnóstico diferencial con otros carcinomas primarios de pulmón, el carcinoma microcítico se puede asemejar morfológicamente al carcinoma basaloides de células escamosas, y la expresión positiva de p40 apoyará este último diagnóstico.

Resumen de respuesta

Para confirmar el fenotipo neuroendocrino, se debe agregar un panel de marcadores neuroendocrinos (cromogranina, sinaptofisina, CD56 y/o INSM1). Además, un marcador de

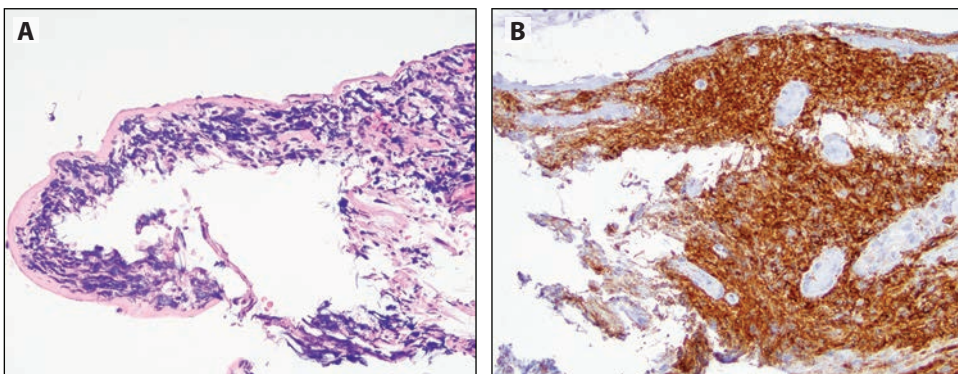


Figura 5-4. (A) Biopsia pequeña, triturada y denudada de las vías respiratorias, con células pequeñas y azules poco preservadas en la tinción H&E de rutina. (B) La tinción difusa para el antígeno leucocitario común (LCA)-CD45 confirma la impresión morfológica de tejido linfoide asociado a bronquio (BALT).

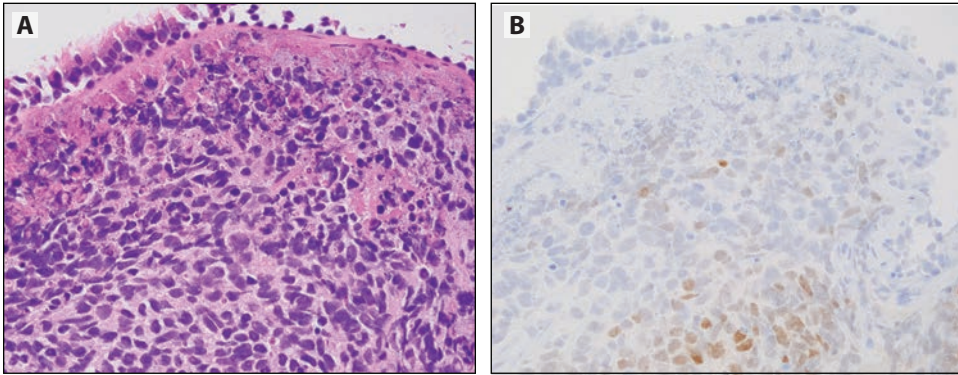


Figura 5-5. (A) Biopsia endobronquial contenida de un carcinoma microcítico en la tinción con H&E. **(B)** Tinción nuclear positiva multifocal para proteína 1 asociada al insulinoma (INSM1).

proliferación es útil en biopsias pequeñas que tienen un artefacto de estiramiento significativo. La inclusión de marcadores de panqueratina permite diferenciar entre un tumor neuroendocrino y un linfoma. La inclusión de p40 puede evitar el problema de confundir un carcinoma basaloide de células escamosas con un carcinoma neuroendocrino de alto grado.

¿Cuáles son los escenarios de diagnóstico difíciles en las biopsias pequeñas?

Los artefactos asociados a las biopsias pequeñas, como la mala preservación celular, el artefacto de estiramiento y la distorsión, suelen impedir la interpretación clara de las estructuras benignas y enmascaran las características morfológicas de las células tumorales. En algunos escenarios, la IHQ puede ayudar a resaltar las poblaciones de células benignas o malignas. En otros, el patólogo debe confiar por completo en los indicios morfológicos y en el contexto. Puede ser difícil distinguir entre glándulas submucosas poco preservadas o endotelio reactivo y un adenocarcinoma infiltrativo en una biopsia endobronquial. La tinción para TTF1 resalta el adenocarcinoma infiltrado, pero debe ser negativa en componentes benignos de la pared de las vías respiratorias cuando se usa un clon de alta especificidad (8G7G3/1) ([figura 5-6](#)).

Por otro lado, el patólogo no debe sobreinterpretar los neumocitos reactivos atrapados o adyacentes positivos para TTF1 como indicativos de un diagnóstico de adenocarcinoma ([figura 5-7](#)). Una cuidadosa referencia cruzada de la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) en un corte seriado garantiza que se evalúe la inmunorreactividad en la población apropiada.

Resumen de respuesta

Es necesaria una correlación cuidadosa de la histología y las tinciones inmunohistoquímicas para evitar la malinterpretación de estas últimas debido a los artefactos de la biopsia.

¿Cómo se deben manejar las muestras de biopsia para optimizar los resultados de las pruebas de biomarcadores predictivos?

La precisión de las pruebas moleculares depende en gran parte de la calidad de las muestras recibidas que serán evaluadas. La calidad de la muestra (por ejemplo, la preservación y la cantidad de proteínas y de ácido nucleico) depende tanto de los atributos fijos del tumor (tamaño, naturaleza infiltrativa, extensión de los infiltrados inflamatorios, necrosis tumoral, etc.), como de variables que se pueden controlar, como la manipulación de la muestra en la serie de biopsias y el laboratorio de patología. En otra sección de este atlas se analizan muchas de las variables críticas preanalíticas; las biopsias son relativamente únicas debido a

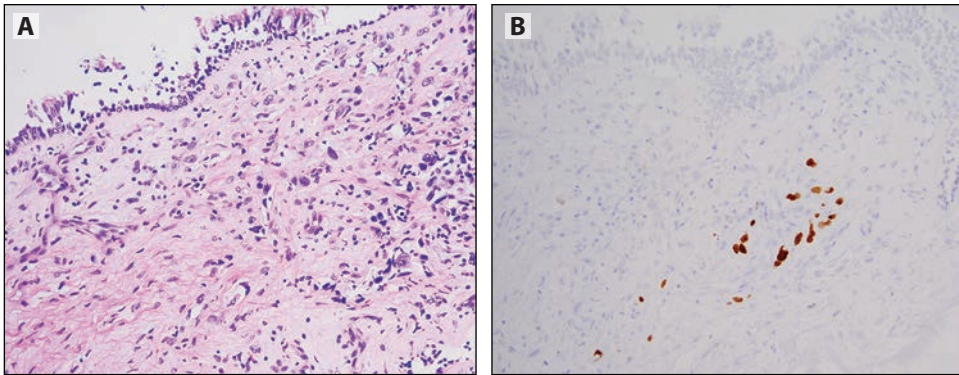


Figura 5-6. (A) Pared de las vías respiratorias con células altamente atípicas mezcladas con inflamación crónica; (B) la tinción para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) resalta las células tumorales infiltrativas.

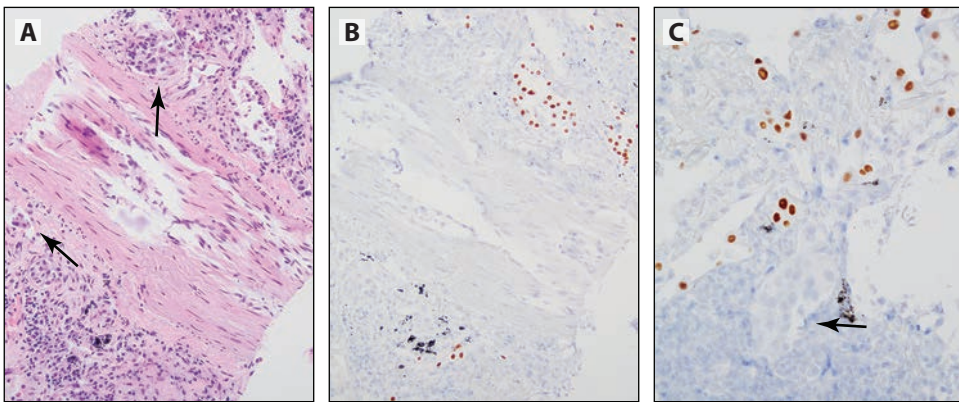


Figura 5-7. (A) Carcinoma de pulmón no microcítico, no especificado, que se presenta extensamente dentro de los linfáticos (*flechas*); (B) los neumocitos reactivos adyacentes son resaltados por la tinción para factor de transcripción tiroideo-1 (TTF1). (C) Nótese las células negativas dentro de los linfáticos (*flecha*) (observadas mejor con un aumento de $\times 400$ en el panel A). Tinción para células tumorales resaltadas con panqueratina (no mostrada).

su naturaleza delicada y la necesidad de una fijación rápida para prevenir el secado y la degradación de la muestra. A menudo, las biopsias de hueso requieren un paso de descalcificación en soluciones ácidas o quelantes antes del procesamiento rutinario de los portaobjetos en los laboratorios de histología. Las soluciones ácidas (ácido clorhídrico, ácido fórmico) degradan las proteínas y los ácidos nucleicos, y pueden deteriorar considerablemente la reactividad por IHQ, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas moleculares de secuenciado (Lindeman et al., 2013; Maclary et al., 2017). Las soluciones quelantes, como las que contienen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), son relativamente eficaces para la descalcificación de biopsias pequeñas, con una preservación mejorada de la antigenicidad de las proteínas y la integridad de los ácidos nucleicos, así como con menores efectos negativos sobre la IHQ y los estudios moleculares (Schrijver et al., 2016).

En los estudios de un presunto carcinoma de pulmón no microcítico es fundamental que el patólogo considere la posible necesidad de realizar pruebas posteriores de biomarcadores predictivos, entre ellos la IHQ para ligando 1 de muerte programada (PD-L1), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o la IHQ para quinasa del linfoma anaplásico (ALK) o para el oncogén 1 c-ros (ROS1), el perfil molecular para variación de secuencia en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y en el protooncogén B-raf (*BRAF*), así como

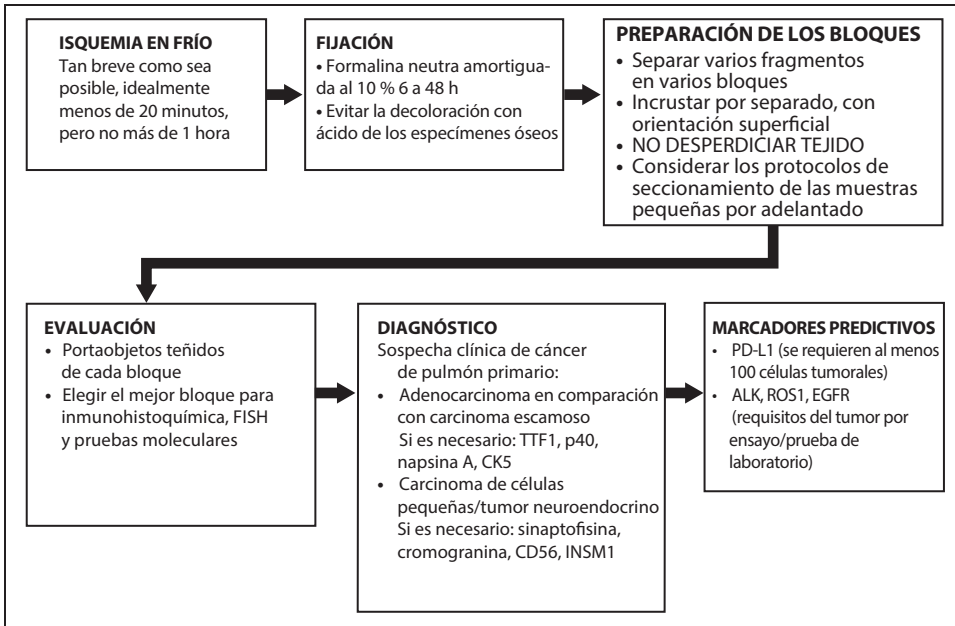


Figura 5-8. Descripción general de los procesos de laboratorio sugeridos para la preparación de una biopsia pequeña. ALK = quinasa del linfoma anaplásico; CK5 = citoqueratina 5; EGFR = receptor del factor de crecimiento epidérmico; FISH = hibridación fluorescente *in situ*; INSM1 = proteína 1 asociada al insulinoma; PD-L1 = ligando 1 de muerte programada; ROS1 = proteína de oncogén 1 c-ros; TTF1 = factor de transcripción tiroideo 1.

algunas otras posibles dianas terapéuticas (Lindeman et al., 2018). Por lo tanto, es esencial el uso prudente de la IHQ diagnóstica. El flujo de trabajo de laboratorio se debe adaptar para manejar muestras pequeñas que pueden demandar un gran número y diversidad de pruebas clínicas (figura 5-8).

Algunos laboratorios proponen que se defina un protocolo de biopsia de “prioridad molecular” (Aisner et al., 2016) el cual marca una muestra para manipulación dedicada en el laboratorio de histología, a fin de incluir un embebido separado y una orientación superficial de los fragmentos de biopsia individuales, con protocolos de corte de portaobjetos arriba y al frente, para garantizar que se dispone de portaobjetos no teñidos adecuados para IHQ diagnóstica y predictiva, así como para pruebas moleculares y/o citogenéticas. Las improntas por toque o los frotis hechos a partir de la biopsia fresca por aguja gruesa también se pueden usar para análisis molecular (Roh, 2019). Puesto que este enfoque consume más tiempo y requiere más trabajo, es esencial que el laboratorio de patología trabaje junto con los clínicos que obtienen estas biopsias para garantizar que la indicación y la necesidad potencial de pruebas genómicas queden claras al momento de la recepción de la muestra.

Los requerimientos mínimos de pruebas de biomarcadores predictivos varían dependiendo de la diana y de la prueba en cuestión. La etiqueta diagnóstica complementaria para la prueba *IHQ PD-L1 pharmDx* requiere al menos de 100 células tumorales; la puntuación de proporción tumoral PD-L1 se puede subestimar en las muestras con menos de 100 células tumorales (Gagne et al., 2019). La prueba FISH para *ALK* (Abbott/Vysis) requiere de 50 núcleos tumorales. Sin embargo, la IHQ para *ALK* no requiere un número mínimo de núcleos tumorales; lo mismo ocurre para la IHQ de *ROS1*, la cual se puede emplear como herramienta de cribado para la detección de la fusión de *ROS1*. Los métodos moleculares como las pruebas de secuenciación de nueva generación basadas en ADN y ARN pueden detectar cada vez más eventos de fusión,

incluso en muestras pequeñas con contaminación significativa por células benignas. La detección de fusión basada en ARN (incluso para *ALK*, *ROS1*, protooncogén ret [*RET*], receptor de tirosina quinasa neurotrópico [*NTRK1-3*]) puede ser una herramienta poderosa en muestras limitadas debido a que está optimizada para detectar transcritos expresados que pueden estar presentes a un nivel bastante elevado en las células tumorales y, de este modo, se pueden detectar, incluso en muestras subóptimas (Davies et al., 2018; Benayed et al., 2019).

Resumen de respuesta

Las biopsias pequeñas juegan un papel crucial en la atención del paciente. Por lo tanto, se debe establecer un protocolo detallado para utilizar el tejido en cada laboratorio para determinar los marcadores predictivos. Es fundamental tener presentes las limitaciones, los problemas y los requisitos de cada biomarcador, a fin de establecer un flujo de trabajo eficaz.

Conclusiones

Las tinciones inmunohistoquímicas son una herramienta poderosa para clasificar el carcinoma poco diferenciado, en especial en muestras de biopsia en donde los artefactos causados por los procedimientos y el muestreo se podrían convertir en un inconveniente.

Los patólogos deben aplicar los paneles y algoritmos recomendados para la clasificación y la determinación de los marcadores predictivos a fin de mejorar la utilización del material de biopsias pequeñas, lo que conducirá a un diagnóstico preciso y la identificación de biomarcadores predictivos.

Referencias

- Aisner DL, Rumery MD, Merrick DT, et al. Do more with less: tips and techniques for maximizing small biopsy and cytology specimens for molecular and ancillary testing: the University of Colorado experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(11):1206-1220.
- Benayed R, Offin M, Mullaney K, et al. High yield of RNA sequencing for targetable kinase fusions in lung adenocarcinomas with no mitogenic driver alteration detected by DNA sequencing and low tumor mutation burden. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4712-4722.
- Churg AM, Myers JL, Tazelaar HD, et al. *Thurlbeck's Pathology of the Lung*. 3.^a ed. Thieme; 2005.
- Davies KD, Le AT, Sheren J, et al. Comparison of molecular testing modalities for detection of ROS1 rearrangements in a cohort of positive patient samples. *J Thorac Oncol*. 2018;13(10):1474-1482.
- Gagne A, Wang E, Bastien N, et al. Impact of specimen characteristics on PD-L1 testing in non-small cell lung cancer: validation of the IASLC PD-L1 testing recommendations. *J Thorac Oncol*. 2019;14(12):2062-2070.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346.
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-859.
- Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, et al. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol*. 2010;5(4):442-447.
- Maclary SC, Mohanty SK, Bose S, et al. Effect of hydrochloric acid decalcification on expression pattern of prognostic markers in invasive breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(2):144-149.
- Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphological differentiation on biopsy specimens: utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(1):15-25.
- Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol*. 2010;5(4):436-441.
- Nishino M, Hoang MP, Della Pelle P, et al. Napsin A/p40 antibody cocktail for subtyping non-small cell lung carcinoma on cytology and small biopsy specimens. *Cancer Cytopathol*. 2016;124(7):472-484.

Ofiara LM, Navasakulpong A, Ezer N, et al. The importance of a satisfactory biopsy for the diagnosis of lung cancer in the era of personalized treatment. *Curr Oncol*. 2012;19(comp. 1):S16-23.

Roh MH. The utilization of cytologic and small biopsy samples for ancillary molecular testing. *Mod Pathol*. 2019;32(comp. 1):77-85.

Schrijver WA, van der Groep P, Hoefnagel LD, et al. Influence of decalcification procedures on immunohistochemistry and molecular pathology in breast cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(12):1460-1470.

Tran L, Mattsson JS, Nodin B, et al. Various antibody clones of napsin A, thyroid transcription factor 1, and p40 and comparisons with cytokeratin 5 and p63 in histopathological diagnostics of non-small cell lung carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(9):648-659.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. *WHO Classification of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*.

4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(5):668-684.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-285.

Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.

Zhao W, Wang H, Peng Y, et al. ΔNp63, CK5/6, TTF-1 and napsin A, a reliable panel to subtype non-small cell lung cancer in biopsy specimens. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):4247-4253.

Marcadores inmunitarios en la clasificación de los principales cánceres de pulmón resecaados

6

Por Sabina Berezowska, Andrew G. Nicholson, William D. Travis, Alain C. Borczuk y Ming Sound Tsa

Introducción

La presencia de patrones y características morfológicas determinantes es suficiente para el diagnóstico de los principales tipos de carcinoma no microcítico (CNM) en cerca del 60 % de las biopsias (Nicholson et al., 2010; Loo et al., 2010) y en el 80 % de las resecciones. En el caso del adenocarcinoma, estos patrones son el lepidico, el acinar, el papilar, el micropapilar, la(s) arquitectura(s) cribiforme(s) y/o la producción de mucina, así como características como la morfología en anillo de sello (Travis et al., 2011). En el caso del carcinoma de células escamosas, estas son la queratinización y la formación de perlas escamosas con puentes intercelulares. En los casos en los que no se identifican estas características y las tinciones para mucina son negativas, se deben aplicar tinciones inmunohistoquímicas para permitir una mejor tipificación de los CNM. Este concepto de tipificación de tumores morfológicamente no diferenciados de acuerdo con sus perfiles de expresión inmunohistoquímica fue recomendado en la clasificación del 2015 por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Travis et al., 2015). En biopsias pequeñas y en muestras de citología, el número de tinciones usadas para pruebas de marcadores diagnósticos o predictivos se debe mantener en el mínimo para preservar la mayor cantidad posible de tejido para análisis molecular (según lo discutido en el capítulo 5), y las resecciones se deben limitar al mínimo necesario para una clasificación precisa.

¿Cuál es la mejor combinación de marcadores en la práctica cotidiana para diferenciar el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas?

En el carcinoma no microcítico resecaado, morfológicamente no diferenciado y sin morfología neuroendocrina ([figura 6-1A](#) y [B](#)), el panel más útil y que por lo general es suficiente para diferenciar entre el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas consiste en el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1; clon 8G7G3/1) y p40 (Yatabe et al., 2019). Sin tener en cuenta la cuestión de la enfermedad metastásica, la expresión de TTF1 caracteriza al tumor como un adenocarcinoma de pulmón sobre otras categorías importantes de carcinoma de células no escamosas ([figura 6-1C](#) y [D](#)). TTF1 es un marcador nuclear expresado entre el 75 % y más del 80 % de los adenocarcinomas pulmonares primarios no mucinosos, dependiendo

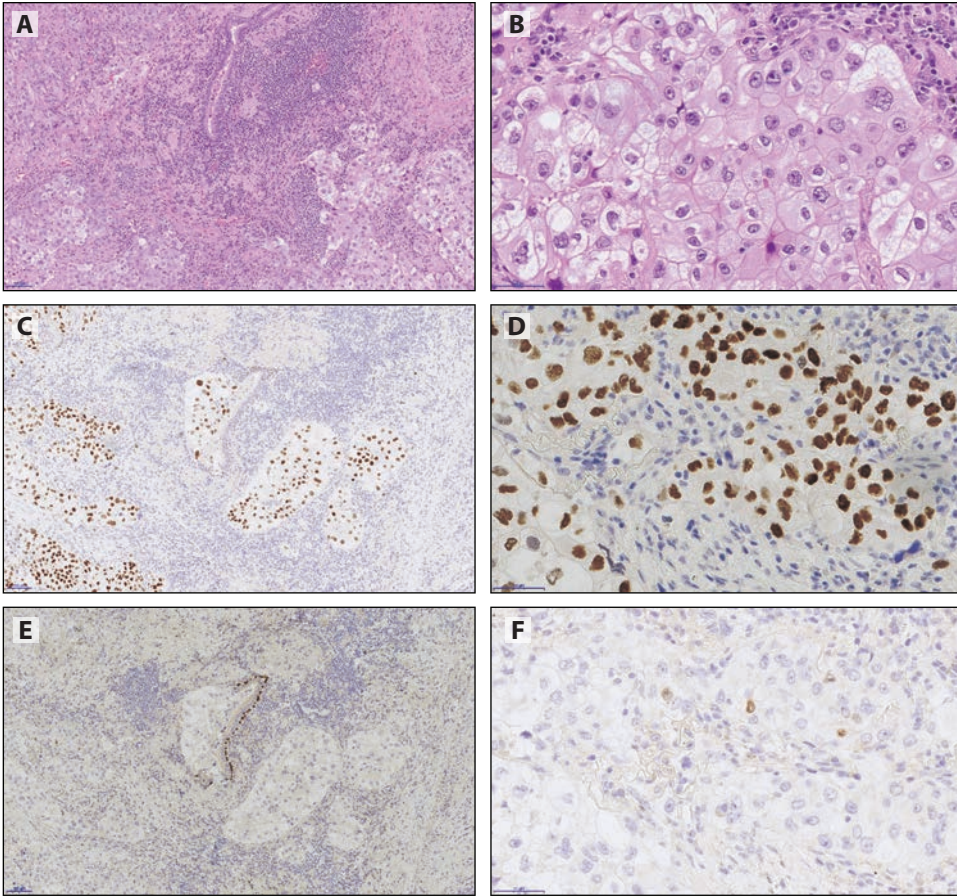


Figura 6-1. Uso del factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y p40 para clasificar el carcinoma poco diferenciado en cánceres de pulmón resecaados. Este adenocarcinoma de patrón sólido se tiñe con TTF1 y no con p40. La tinción débil para p40 en un tumor positivo para TTF1 no indica una histología adenoescamosa: (A, C, E) $\times 10$; (B, D, F) $\times 40$; (A y B) H&E, (C y D) TTF1-8G7G3/1 y (E y F) p40.

del clon, con mayor especificidad pero menor sensibilidad del clon 8G7G3/1 en comparación con el clon SPT24 (Ordóñez, 2012; Kadota et al., 2015; Kashima et al., 2014). La positividad focal para TTF1 (clon 8G7G3/1) es suficiente para identificar al tumor como TTF1 positivo, y la reactividad puede ser débil (el TTF1 se discute en detalle en el capítulo 7). El P40 (Δ Np63) es un marcador nuclear de diferenciación escamosa. En los tumores positivos para TTF1 se puede observar una positividad focal o débil para p40; estos casos se deben clasificar como adenocarcinomas.

La napsina A puede ser un marcador valioso para el diagnóstico de adenocarcinoma en casos TTF1 negativos de tumores pulmonares primarios, puesto que se reporta constantemente que los carcinomas de células escamosas son negativos para napsina A (Kadota et al., 2015; Whithaus et al., 2012). La napsina A (monoclonal) muestra un patrón citoplasmático granular (figura 6-2). Se expresa en los neumocitos tipo II, en los macrófagos alveolares, en los túbulos renales, las glándulas exocrinas y los conductos pancreáticos. Se prefiere el anticuerpo monoclonal sobre el anticuerpo policlonal debido a su mayor especificidad (Mukhopadhyay y Katzenstein, 2012). Sin embargo, no se recomienda su uso si el TTF1 es positivo, ya que muchos adenocarcinomas de pulmón coexpresan TTF1 y napsina A.

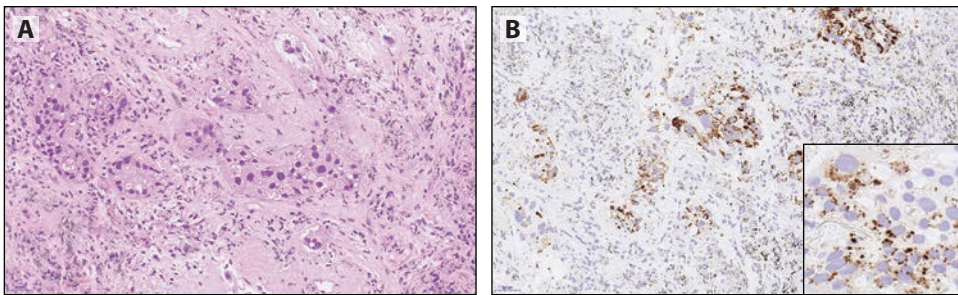


Figura 6-2. La napsina A puede ser un marcador valioso para el diagnóstico de adenocarcinoma en casos de tumores pulmonares primarios negativos para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1). La napsina A (monoclonal) muestra un patrón citoplasmático granular (*recuadro* $\times 40$). $\times 20$ (A) H&E y (B) napsina A.

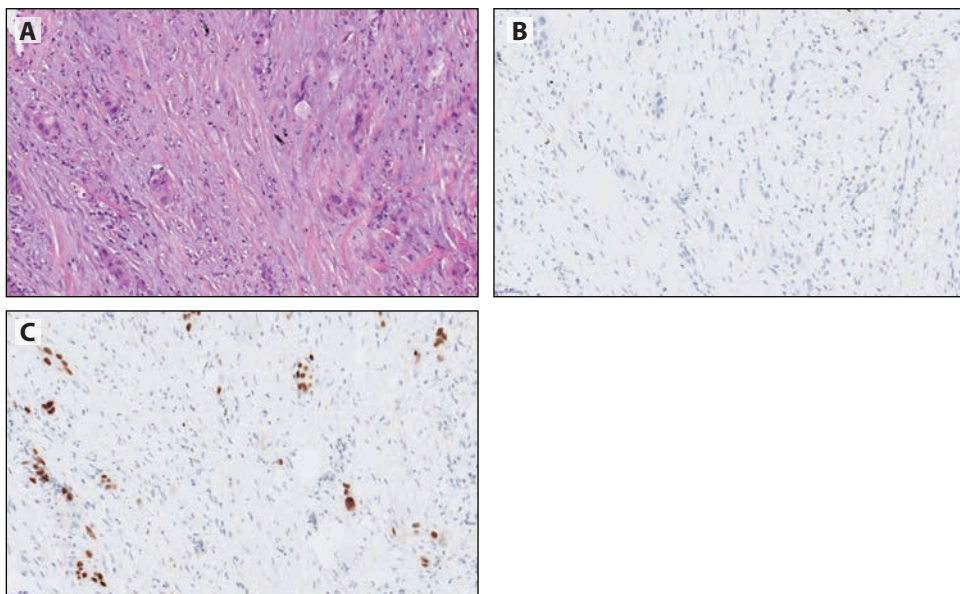


Figura 6-3. Los tumores altamente infiltrativos y morfológicamente no diferenciados sin (A) queratinización o (B) expresión de factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) se pueden tipificar como carcinomas de células escamosas si muestran una positividad fuerte para p40, como en el caso acá mostrado. $\times 20$ (A) H&E, (B) TTF1 y (C) p40.

En el caso de una coexpresión de TTF1 y p40 en las mismas células tumorales de un carcinoma no microcítico morfológicamente no diferenciado, una positividad débil para TTF1 es suficiente para tipificar los tumores como adenocarcinomas.

Los carcinomas de células escamosas expresan p40 en más del 50 % de las células tumorales y deben ser negativos para TTF1 ([figura 6-3](#)). P63 muestra una sensibilidad similar a p40, pero es menos específico (Bishop et al., 2012) y no se debe usar si se dispone de p40. También se puede usar citoqueratina 5/6 (CK5/6) como un marcador adicional de diferenciación escamosa, pero no permite diferenciar entre el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas cuando se usa por sí sola (Righi et al., 2011; Rekhtman et al., 2011; Warth et al., 2012).

El carcinoma de células escamosas acantolítico se puede confundir con el adenocarcinoma y, en algunos casos, con el angiosarcoma epiteloide. En estos casos, una combinación de TTF1 y p40 puede ser muy útil para confirmar un carcinoma de células escamosas ([figura 6-4](#)) con un panel expandido, si ambos son negativos.

Debido a su baja especificidad, la positividad para citoqueratina 7 (CK7) no se debe usar para separar la diferenciación adenocarcinomatosa de la escamosa ([figura 6-5](#)). Aunque la CK7 es positiva

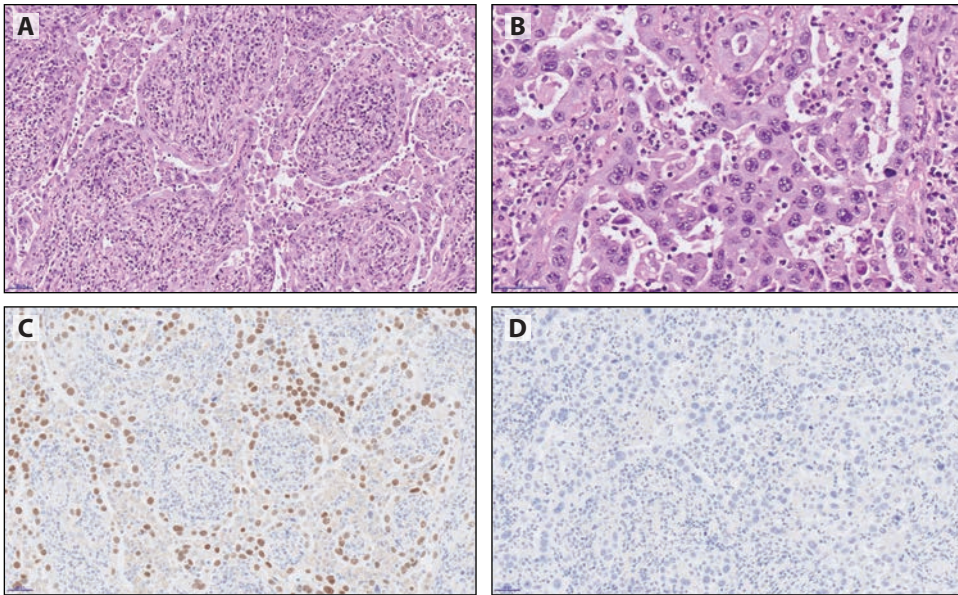


Figura 6-4. Debido a las consecuencias terapéuticas, el umbral para la aplicación de inmunohistoquímica para validar la subtipificación del carcinoma no microcítico (CNM) debe ser bajo en casos inciertos. **(A y B)** El patrón de crecimiento acantolítico de este tumor sugiere un adenocarcinoma. No obstante, el patrón de expresión inmunohistoquímica con fuerte positividad para **(C)** p40 y **(D)** negatividad para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) confirmó un carcinoma de células escamosas. **(A, C, y D)** $\times 20$; **(B)** $\times 40$; **(A y B)** H&E, **(C)** p40 y **(D)** TTF1.

en el 91 % y el 100 % de los adenocarcinomas de pulmón, los carcinomas de células escamosas pueden mostrar una positividad fuerte y difusa para CK7, reportada del 5 % al 77 % de los casos (Warth et al., 2012; Mukhopadhyay y Katzenstein, 2012; Johansson, 2004; Noh y Shim, 2012; Righi et al., 2011; Koh et al., 2014; Gurda et al., 2015). Véase el capítulo 9 para conocer un análisis más detallado del uso de la citoqueratina.

Según lo evidenciado por la expresión fuerte de p40 o la queratinización, no todos los carcinomas pulmonares primarios con diferenciación escamosa representan carcinomas de células escamosas. Algunos tumores morfológicamente no diferenciados con expresión fuerte de p40 pueden representar carcinomas con proteína nuclear en el testículo (NUT) (Haack et al., 2009). Es posible que solo haya una presencia focal de los sitios típicos de queratinización en una muestra de resección ([figura 6-6](#)) (véase el capítulo 14). Los timomas intrapulmonares también pueden mostrar una expresión fuerte y difusa de p40.

En un tumor morfológicamente no diferenciado, la expresión focal de p40 en menos del 10 % del tumor, o la presencia de inmunorreactividad débil, no se debe interpretar como una diferenciación escamosa. En dichos casos, se debe clasificar como un carcinoma de células grandes con características inmunohistoquímicas inciertas y no como un carcinoma de células escamosas no queratinizante.

Resumen de respuesta

En la práctica cotidiana, TTF1 y p40 son suficientes para subtipificar la mayoría de los carcinomas no microcíticos sin definir las características morfológicas o morfología neuroendocrina. Este panel se puede ampliar cuando se sospechen metástasis o variantes poco comunes.

¿Cuál es la función de los marcadores inmunitarios en el diagnóstico del carcinoma adenoescamoso?

El diagnóstico de carcinoma adenoescamoso requiere una muestra por resección con al menos 10 % de cada componente. Al igual que con los adenocarcinomas y los carcinomas de células

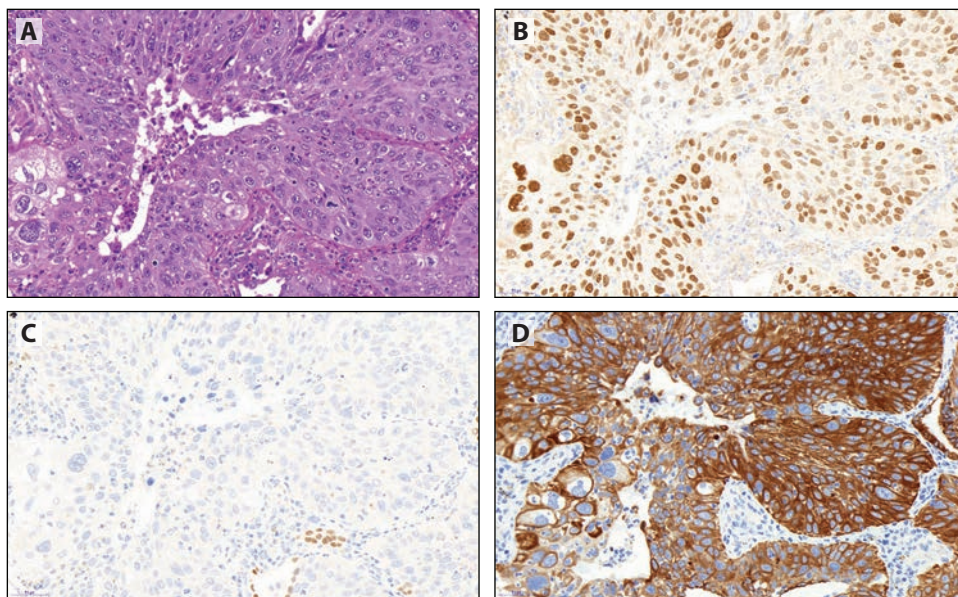


Figura 6-5. Carcinoma de células escamosas no queratinizante con expresión de **(B)** p40, **(C)** ausencia de factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y **(D)** expresión de citoqueratina 7 (CK7) fuerte y homogénea. Se descartó una metástasis de un carcinoma urotelial mediante marcadores inmunitarios adicionales y la historia clínica. **(A-D)** $\times 30$; **(A)** H&E, **(B)** p40, **(C)** TTF1 y **(D)** CK7.

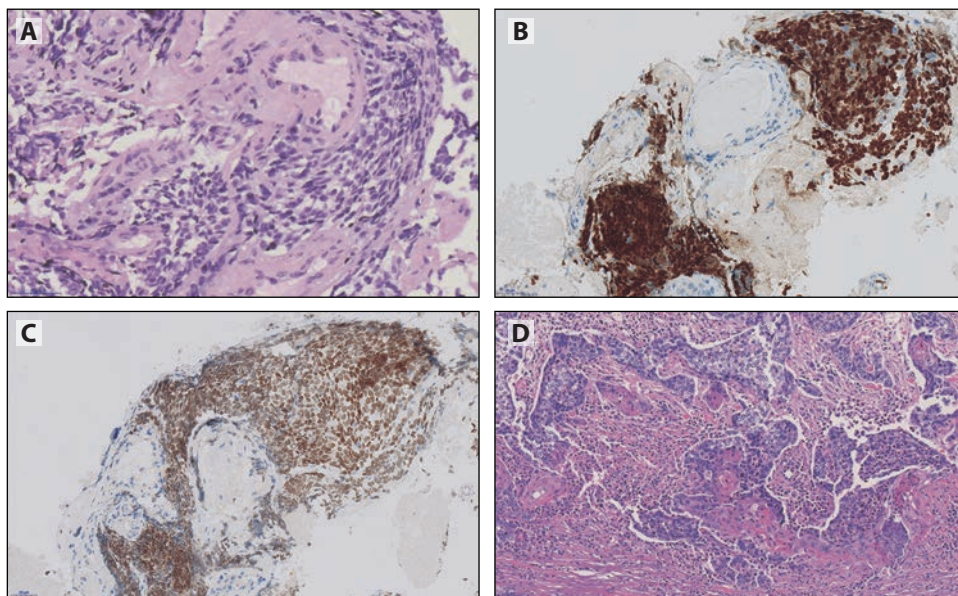


Figura 6-6. El carcinoma con proteína nuclear en el testículo (NUT) se define por la ocurrencia del reordenamiento del gen *NUT*, el cual se puede detectar mediante el anticuerpo monoclonal para NUT disponible, con una positividad nuclear moteada. Es posible que la queratinización solo sea focal. **(A)** $\times 40$; **(B-D)** $\times 20$; **(A y D)** H&E, **(B)** p40 y **(C)** NUT.

escamosas diagnosticados histomorfológicamente, no se necesita confirmación inmunohistoquímica de los dos componentes diferentes en casos de carcinoma adenoescamoso, si consisten en componentes morfológicamente inequívocos de carcinomas de células escamosas y adenocarcinoma (Travis et al., 2015). Cuando uno o ambos componentes están poco diferenciados, se requiere la inmunohistoquímica para respaldar el diagnóstico al demostrar dos componentes claramente

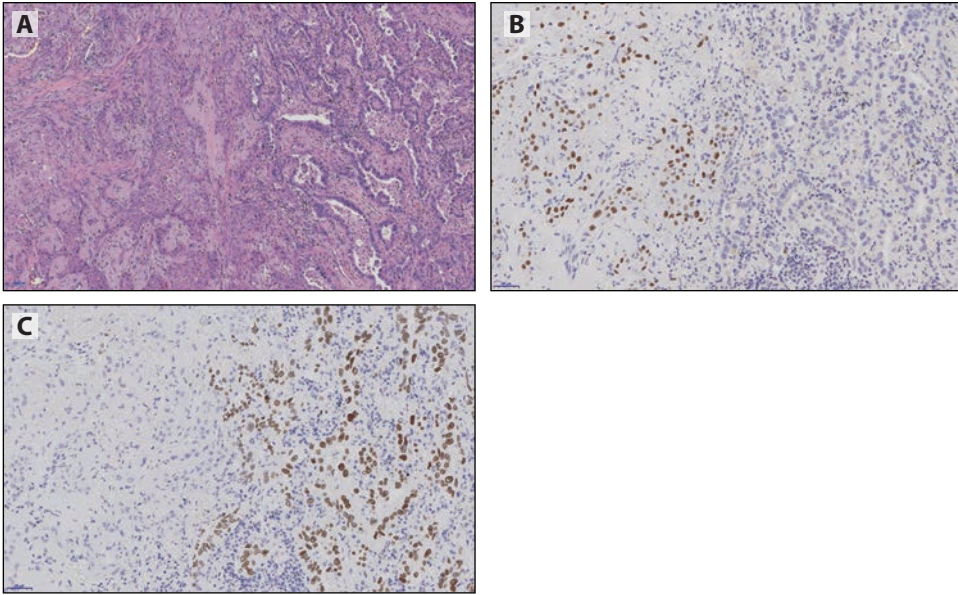


Figura 6-7. Los dos componentes tumorales están claramente delimitados; el componente de carcinoma de células escamosas con expresión de p40/negatividad para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) a la izquierda; y el componente de adenocarcinoma con negatividad para p40/expresión de TTF1 a la derecha. $\times 20$; (A) H&E, (B) p40 y (C) TTF1.

delineados: 1 TTF1 y 1 p40 positivo ([figura 6-7](#)). Cuando la coexpresión de TTF1 y p40 tiene lugar en las mismas células tumorales, dichos casos se deben clasificar como adenocarcinomas.

Resumen de respuesta

La inmunohistoquímica para TTF1 y p40 puede ser útil en el diagnóstico del carcinoma adenoescamoso cuando se resaltan dos poblaciones celulares tumorales distintas.

¿Cuál es la utilidad de la IHQ en el carcinoma sarcomatoide?

El diagnóstico del carcinoma pleomórfico requiere la identificación de adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células grandes junto con carcinoma de células fusiformes o de células gigantes ([figura 6-8A](#) y [C](#)). En este contexto, el uso de TTF1 y p40 puede ayudar a caracterizar el componente carcinomatoso. El componente de carcinoma de células fusiformes o de células gigantes a menudo es positivo solo para citoqueratina, y esto puede ser de utilidad en la clasificación del carcinoma puro de células fusiformes o de células gigantes ([figura 6-8B](#) y [D](#)). Se ha reportado inmunorreactividad nuclear para la proteína homeobox 1 de unión a E-box de dedo de zinc (ZEB1) en el componente sarcomatoide de estos tumores (Matsubara et al., 2014; Viswanathan et al., 2019), pero su función precisa en el diagnóstico sigue siendo incierta ([figura 6-8E](#)). En algunos casos puede ser necesario un espectro amplio de citoqueratinas en vez de una sola citoqueratina para confirmar el origen epitelial del tumor.

El diagnóstico de blastoma requiere una combinación de adenocarcinoma tipo fetal como un componente sarcomatoide, usualmente heterólogo, de cartílago o músculo esquelético maligno. Puesto que este es un tumor mutado para β -catenina, presenta inmunorreactividad nuclear para β -catenina, como se observa en el adenocarcinoma de tipo fetal (véase la [figura 13-5](#)).

El diagnóstico de carcinosarcoma incluye una combinación de carcinoma y de un componente sarcomatoide heterólogo. El uso de la inmunohistoquímica en este contexto puede estar

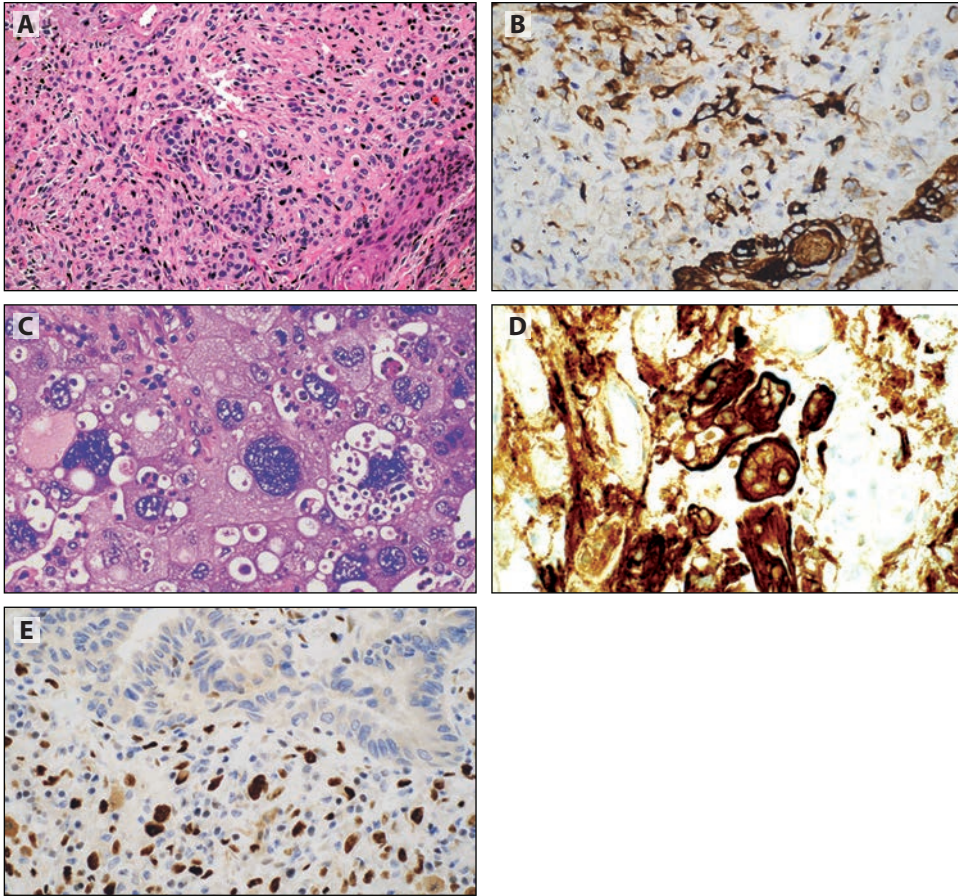


Figura 6-8. Inmunohistoquímica en el carcinoma sarcomatoide. (A) El carcinoma pleomórfico muestra reactividad a citoqueratina en el componente escamoso, así como en (B) el componente de células fusiformes. (C) Un carcinoma de células gigantes se confirma como carcinoma usando la inmunorreactividad para (D) citoqueratina. Aunque su uso diagnóstico sigue siendo incierto, la inmunohistoquímica para ZEB1 muestra tinción nuclear en el componente sarcomatoide de un carcinoma pleomórfico. (A, B, E) $\times 20$; (C y D) $\times 40$; (A y C) H&E, (B y D) citoqueratina AE1/AE3 y (E) ZEB1.

restringido por la caracterización o la confirmación de un elemento heterólogo, como la mioquina o el MYOD1, a fin de confirmar un componente rabdiosarcomatoso.

Resumen de respuesta

La inmunorreactividad para la citoqueratina puede ser útil para confirmar un patrón fusiforme maligno o de carcinoma de células gigantes en el carcinoma pleomórfico. La inmunohistoquímica en subtipos poco comunes puede ayudar a confirmar elementos heterólogos, o un componente de adenocarcinoma fetal en un blastoma.

¿Cuál es la función de la inmunohistoquímica en el diagnóstico del carcinoma de células grandes?

Según lo definido en la clasificación actual de la OMS del 2015, el carcinoma de células grandes es un cáncer no microcítico no diferenciado, sin características morfológicas ([figura 6-9A](#)) o inmunohistoquímicas que permitan una mayor subtipificación. Por lo tanto, el carcinoma de células grandes es un diagnóstico de exclusión y, de este modo, solo se puede considerar en

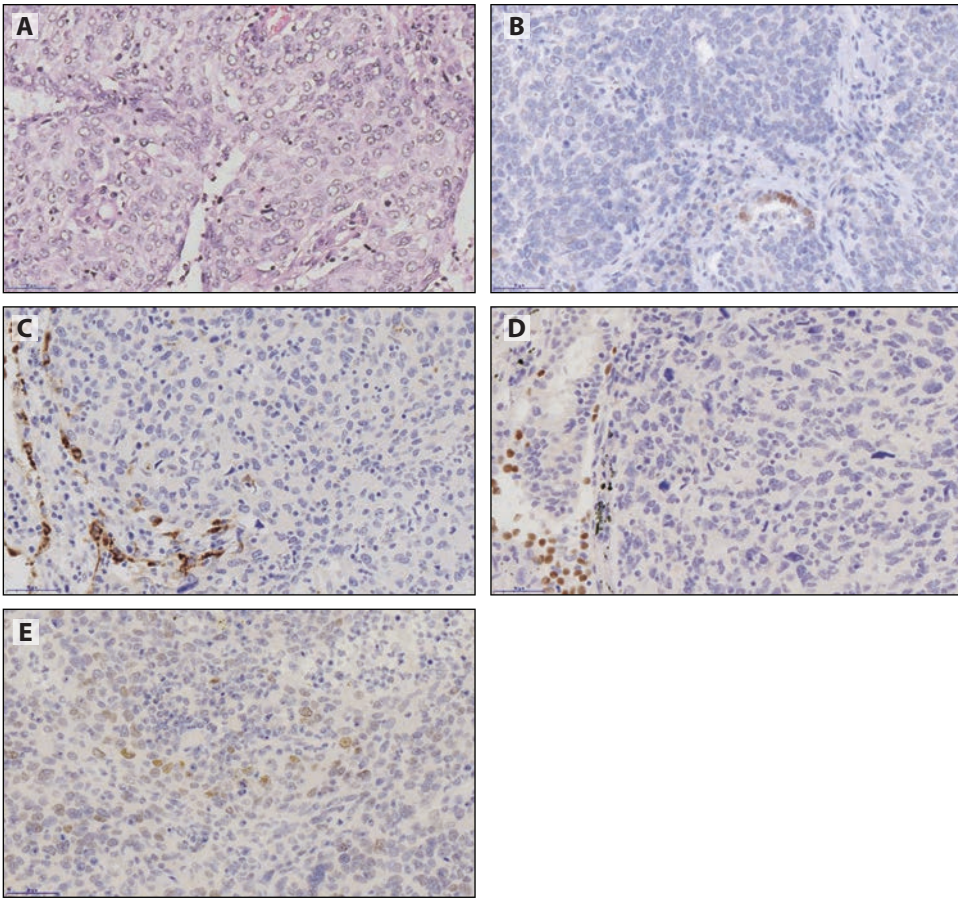


Figura 6-9. Carcinoma de células grandes. **(A)** Carcinoma no microcítico morfológicamente no diferenciado **(B)** negativo para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1), **(C)** napsina A, **(D)** p40 y **(E)** p63. $\times 40$; **(A)** H&E, **(B)** TTF1, **(C)** napsina A, **(D)** p40 y **(E)** p63.

muestras de resección. Además de las inmunotinciones negativas, es necesario que las tinciones para mucina sean negativas para excluir un adenocarcinoma sólido.

TTF1 y p40 deben ser negativos en los carcinomas de células grandes. TTF1 puede resaltar solo los neumocitos que recubren las paredes alveolares preexistentes ([figura 6-9B](#)). La napsina A también debe ser negativa ([figura 6-9C](#)) y p40 solo resalta la capa de células basales bronquiolares si está presente, lo cual sirve como un control positivo interno ([figura 6-9D](#)). Se puede observar una positividad débil y focal para p63 en los carcinomas o adenocarcinomas de células grandes, la cual no es específica ([figura 6-9E](#)). En particular, esto no es suficiente para tipificar el tumor como un carcinoma de células escamosas.

Este diagnóstico requiere de una muestra de resección, por lo que el bloque para la realización de la inmunohistoquímica se debe seleccionar luego de revisar todos los portaobjetos tumorales, a fin de identificar el mejor bloque que permita demostrar un adenocarcinoma o un carcinoma de células escamosas mediante la revisión de las tinciones con hematoxilina y eosina (H&E).

Si los análisis iniciales de TTF1 y p40 son negativos en un tumor sólido, se deben realizar tinciones adicionales para confirmar que el tumor es un carcinoma (tinciones de citoqueratina) en vez de un melanoma, linfoma o sarcoma, y se deben considerar estudios para excluir metástasis, dependiendo del contexto clínico y las características morfológicas (véase el capítulo 16).

Además, los carcinomas no especificados/carcinomas de células grandes se pueden considerar para la tinción con SMARCA4, dependiendo de las características histológicas. En el 80 % de los casos se mostró que los adenocarcinomas pulmonares que eran deficientes en SMARCA4 eran negativos para TTF1 (Agaimy et al., 2017; Herpel et al., 2017). No obstante, esto no se debe confundir con el tumor torácico deficiente en SMARCA4 (véase el capítulo 15).

Resumen de respuesta

En los carcinomas no diferenciados negativos para mucicarmina, sin tinción para TTF1, napsina A o p40, se puede hacer un diagnóstico de carcinoma de células grandes tras considerar el carcinoma deficiente en SMARCA4.

Conclusiones

En la práctica cotidiana, TTF1 y p40 son suficientes para subtipificar la mayoría de los carcinomas no microcíticos sin definir las características morfológicas o morfología neuroendocrina. Este panel se puede ampliar cuando se sospechen metástasis o variantes poco comunes.

Referencias

- Agaimy A, Fuchs F, Moskalev EA, et al. SMARCA4-deficient pulmonary adenocarcinoma: clinicopathological, immunohistochemical, and molecular characteristics of a novel aggressive neoplasm with consistent TTF1^{neg}/CK7^{pos}/HepPar-1^{pos} immunophenotype. *Virchows Arch.* 2017;471(5):599-609.
- Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, et al. p40 ($\Delta Np63$) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25(3):405-415.
- Gurda GT, Zhang L, Wang Y, et al. Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF1, napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases. *Clin Transl Med.* 2015;4:16.
- Haack H, Johnson LA, Fry CJ, et al. Diagnosis of NUT midline carcinoma using a NUT-specific monoclonal antibody. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(7):984-991.
- Herpel E, Rieker RJ, Dienemann H, et al. SMARCA4 and SMARCA2 deficiency in non-small cell lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens. *Ann Diagn Pathol.* 2017;26:47-51.
- Johansson L. Histopathologic classification of lung cancer: relevance of cytokeratin and TTF-1 immunophenotyping. *Ann Diagn Pathol.* 2004;8(5):259-267.
- Kadota K, Nitadori J, Rekhtman N, et al. Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(9):1170-1180.
- Kashima K, Hashimoto H, Nishida H, et al. Significant expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary squamous cell carcinoma detected by SPT24 monoclonal antibody and CSA-II system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(2):119-124.
- Koh J, Go H, Kim MY, et al. A comprehensive immunohistochemistry algorithm for the histological subtyping of small biopsies obtained from non-small cell lung cancers. *Histopathology.* 2014;65(6):868-878.
- Loo PS, Thomas SC, Nicholson MC, et al. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchia biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):442-447.
- Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Int.* 2014;64(11):560-568.
- Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Comparison of monoclonal napsin A, polyclonal napsin A, and TTF-1 for determining lung origin in metastatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(5):703-711.
- Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):436-441.
- Noh S, Shim H. Optimal combination of immunohistochemical markers for subclassification of non-small cell lung carcinomas: a tissue microarray study of poorly differentiated areas. *Lung Cancer.* 2012;76(1):51-55.
- Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20(5):429-444.

Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, et al. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol*. 2011;24(10):1348-1359.

Righi L, Graziano P, Fornari A, et al. Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer*. 2011;117(15):3416-3423.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al, eds. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-285.

Viswanathan K, Siddiqui MT, Borczuk AC. The diagnostic utility of zinc E-box-1 (ZEB1) transcription factor for identification of pulmonary sarcomatoid carcinoma in cytologic and surgical specimens. *J Am Soc Cytopathol*. 2019;9(1):55-61.

Warth A, Muley T, Herpel E, et al. Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. *Histopathology*. 2012;61(6):1017-1025.

Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, et al. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(2):155-162.

Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practice recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.

Factor de transcripción tiroideo 1

7

Por Prudence A. Russell, Jin-Haeng Chung y Yasushi Yatabe

Introducción

El factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) es una proteína nuclear de 38 kDa que pertenece a la familia de genes *NKX2-1* de los factores de transcripción de homeodominio, y es codificada por el gen *NKX2-1* en el cromosoma 14q13 (Ordonez, 2012b). Es necesario para el desarrollo pulmonar y de la glándula tiroides. En un el pulmón normal, TTF1 estimula la producción de proteína secretora de células club (conocidas anteriormente como células de Clara) y proteínas surfactantes específicas del pulmón, y se expresa en los núcleos de los neumocitos tipo II y las células club al proporcionar un control interno positivo útil (Ordonez, 2012b). El TTF1 es uno de los anticuerpos más útiles y ampliamente usados en la práctica clínica. Usualmente se emplea en dos contextos clinicopatológicos principales: la diferenciación entre el adenocarcinoma de pulmón primario y los carcinomas de otros sitios primarios, y el diagnóstico diferencial del adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma de células escamosas en relación con el carcinoma no microcítico (CNM) morfológicamente indeterminado. Estos dos contextos requieren la especificidad de la tinción para TTF1, lo que implica que se debe sacrificar algo de sensibilidad a cambio. Además, es de suma importancia determinar el sitio de origen en el pulmón (o en otra parte del cuerpo), así como diferenciar el adenocarcinoma de pulmón del carcinoma de células escamosas, a fin de orientar la toma de decisiones con respecto al tratamiento de los pacientes con CNM avanzado en la era de la medicina de precisión. Esta última cuestión se examina con mayor detalle en el capítulo 5. A riesgo de afirmar algo que es obvio, vale la pena que los patólogos recuerden que el TTF1 se expresa con amplitud en los tumores epiteliales tiroideos. El TTF1 también se encuentra en hasta el 90 % de los carcinomas pulmonares microcíticos, en dos tercios de los carcinomas neuroendocrinos de células grandes y en los tumores carcinoides de células fusiformes (Travis et al., 2015a, 2015b).

En este capítulo se explora el papel crítico del TTF1 en la diferenciación de los adenocarcinomas de pulmón y el adenocarcinoma extrapulmonar, en particular cuando se examinan muestras pequeñas, así como con el carcinoma de células escamosas, haciendo énfasis en las diferencias de tinción entre los clones de TTF1 más comúnmente usados y el alcance de las reacciones requeridas para la positividad del TTF1. También se examinan los problemas preanalíticos relacionados con la inmunotinción para TTF1.

¿Existen diferencias de tinción entre los clones de TTF1 en el adenocarcinoma de pulmón?

Existen varios clones diferentes de TTF1 disponibles comercialmente, entre ellos los anticuerpos policlonales de conejo y de cabra; anticuerpos monoclonales de ratón, como los clones 8G7G3/1, SPT24, BGX-397A, SMP150 y 5S143; así como anticuerpos monoclonales de conejo, como los clones SP141, EP15844, C12-I y G21-G (Ordóñez, 2012b). Sin embargo, nos enfocaremos en los anticuerpos monoclonales de ratón 8G7G3/1 y SPT24, así como el anticuerpo monoclonal de conejo SP141, disponible recientemente, que son los más usados en la práctica clínica (Ordóñez, 2012a, 2012b; Smits et al., 2015; Klebe et al., 2016; Tran et al., 2016).

Al evaluar en primer lugar la sensibilidad y especificidad reportada de los diferentes clones para la detección del adenocarcinoma de pulmón, una revisión reciente sugiere que, en 37 estudios publicados, el 76,7 % de los casos de adenocarcinoma de pulmón fueron positivos con el clon 8G7G3/1, mientras que el 81,3 % de los casos de adenocarcinoma de pulmón en 7 estudios fueron positivos con el clon SPT24 (Ordóñez, 2012b). El único estudio que comparó los tres clones TTF1 de uso amplio indica que el 89 % de los adenocarcinomas de pulmón se tiñó positivamente con 8G7G3/1, el 93 % se tiñó con SPT24 y el 93 % se tiñó con SP141, con un valor de corte del 1 % de tinción para indicar una reacción positiva (Vidarsdottir et al., 2018). Estos resultados destacan que el clon 8G7G3/1 es menos sensible para la detección del adenocarcinoma de pulmón que los clones SPT24 y SP141 ([figura 7-1](#)).

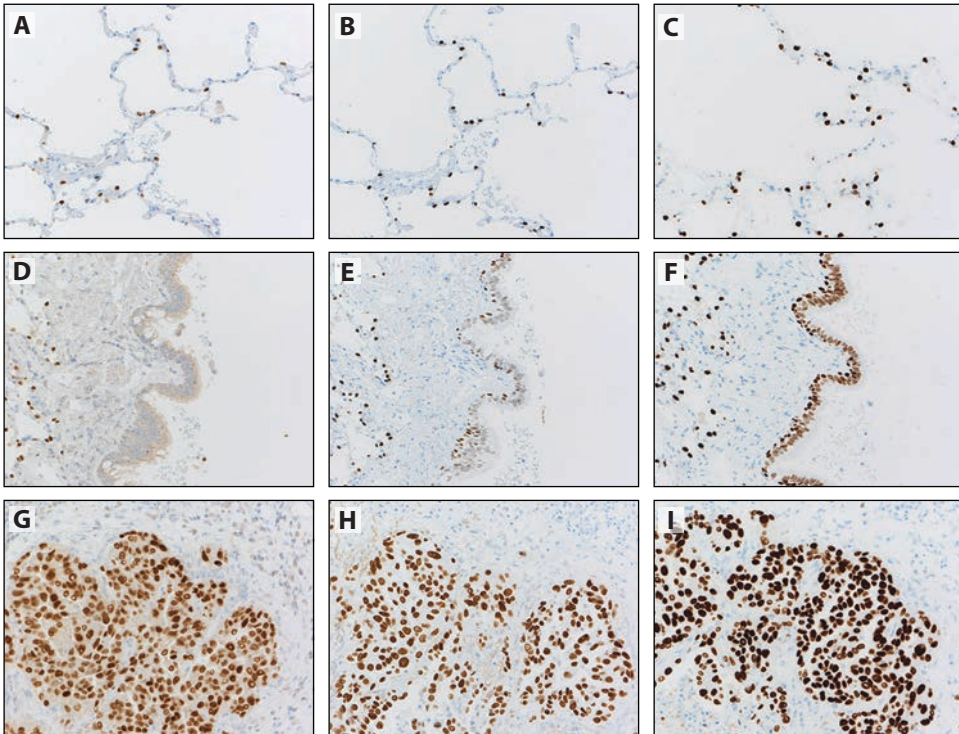


Figura 7-1. Tinción para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) en tejidos pulmonares no neoplásicos ([A-C] parénquima periférico y [D-F] epitelio bronquiolar) y (G-I) adenocarcinoma sólido, usando 8G7G3/1, como se muestra en los paneles A, D y G; SPT24, como se muestra en los paneles B, E y H; y SP141, como se muestra en los paneles C, F e I. La intensidad entre los clones fue diferente debido a que se utilizaron diferentes sistemas de detección y procedimientos de amplificación (sistema Dako Flex para 8G7G3/1; kit de detección IHC OptiView DAB IHC para SPT24 y SP141). Sin embargo, la distribución positiva fue idéntica en el parénquima periférico y el adenocarcinoma, en contraste con la diferencia en el alcance de la tinción en el epitelio bronquiolar.

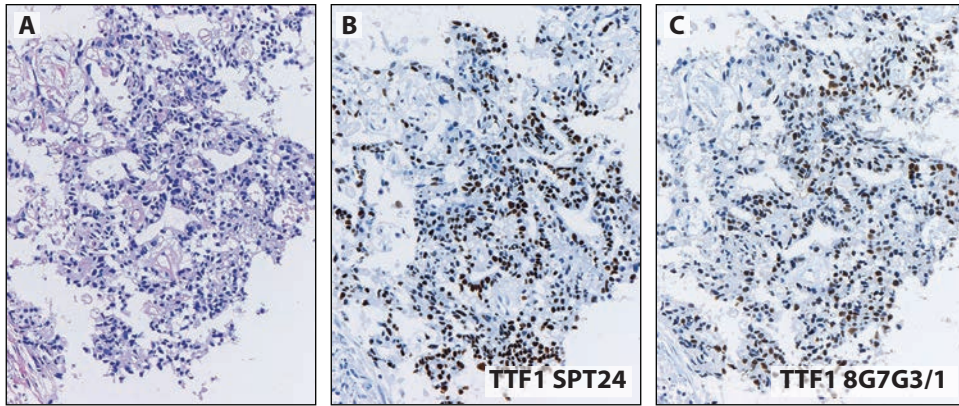


Figura 7-2. Expresión del factor de transcripción tiroideo-1 (TTF1) del cáncer de ovario metastásico al pulmón. **(A)** Las células tumorales (H&E) muestran una reacción positiva con los clones **(B)** SPT24 y **(C)** 8G7G3/1. La expresión del TTF1 en los tumores ginecológicos puede ser un obstáculo en el diagnóstico diferencial de la metástasis y el adenocarcinoma de pulmón primario.

Tabla 7-1. Resultados de la expresión del TTF1 en tumores de sitios primarios distintos del pulmón, como el tracto genital femenino, mama, colon y estómago, en algunos estudios publicados^a

Carcinoma primario	8G7G3/1		SPT24	
	n	Positivo, n (%)	n	Positivo, n (%)
Carcinoma de ovario	615	22 (3,6 %)	161	16 (9,9 %)
Adenocarcinoma endometrial	215	17 (7,9 %)	68	19 (27,9 %)
Adenocarcinoma de cuello uterino	92	3 (3,3 %)	39	6 (15,4 %)
Carcinoma escamoso de cuello uterino	7	0 (0 %)		
Carcinoma de mama	297	4 (1,5 %)	580	13 (2,4 %)
Adenocarcinoma de colon	594	11 (1,8 %)	258	15 (5,8 %)
Adenocarcinoma gástrico	170	3 (1,8 %)	110	1 (0,9 %)

^a Los datos para los clones 8G7G3/1 y SPT24 están modificados con base en los datos de Ordóñez, 2012b.

Si se considera la diferenciación entre el adenocarcinoma de pulmón y el adenocarcinoma proveniente de otros sitios primarios, una revisión reciente que comparó los clones SPT24 y 8G7G3/1 indica que un pequeño porcentaje de adenocarcinomas de sitios primarios diferentes al pulmón puede ser positivo para TTF1 (Ordóñez, 2012b). Estos sitios primarios incluyen el tracto genital femenino (figura 7-2), mama, colon y estómago; y se reportan porcentajes mayores de tinción para el clon SPT24 que para el clon 8G7G3/1 (tabla 7-1). Cabe anotar que se ha postulado que el clon SPT24 tiene una unión más fuerte para la proteína TTF1, lo que da como resultado una positividad nuclear más uniforme y una tinción citoplasmática menos impredecible en comparación con el clon 8G7G3/1, el cual puede exhibir una tinción no específica del citoplasma tanto de los hepatocitos como del carcinoma hepatocelular (Bae et al., 2018; Pan et al., 2004; Smits et al., 2015). Se considera que la unión más fuerte propuesta del SPT24 explica su tinción incrementada en los carcinomas que surgen en sitios diferentes del pulmón, si se compara con el clon 8G7G3/1 (Smits et al., 2015; Compérat et al., 2005). Asimismo, algunas células epiteliales bronquiales basales no neoplásicas se pueden teñir con SPT24; de este modo, cuando se usa este clon, la tinción positiva de las células tumorales se debe diferenciar de cualquier tinción de células no neoplásicas, en particular cuando el tejido está muy fragmentado (figura 7-3) (véase también el análisis adicional incluido en el capítulo 5). Existen muy pocas publicaciones en las que se analice el rendimiento de tinción del nuevo clon SP141. No obstante, los estudios disponibles (Vidarsdóttir et al., 2018; Klebe et al., 2016; Bae et al., 2018; Prabhakaran et al., 2019) parecen indicar que el clon SP141 posee características

similares a las del clon SPT24, con menos especificidad para la detección del adenocarcinoma de pulmón en comparación con el clon 8G7G3/1 ([tabla 7-2](#)).

En el diagnóstico diferencial del adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma de células escamosas, en varios estudios recientes se encontró que la expresión positiva del TTF1 en el carcinoma pulmonar de células escamosas ocurre en bajos porcentajes en general, pero en mayores porcentajes con el clon SPT24 y porcentajes mucho menores, o sin reporte de tinción, con el clon 8G7G3/1 ([tabla 7-2](#); [figura 7-4](#)) (Vidarsdottir et al., 2018; Ordonez, 2012a; Matoso et al., 2010; Kadota et al., 2015; Kashima et al., 2014). Se han reportado hallazgos similares utilizando el clon SP141 (Vidarsdottir et al., 2018; Klebe et al., 2016), y se observa positividad en un pequeño número de carcinomas de células escamosas, los cuales fueron negativos con el clon 8G7G3/1 ([tabla 7-3](#)). Dado el importante papel que tiene la inmunohistoquímica (IHQ) para TTF1 en la definición de las características del adenocarcinoma poco diferenciado de la clasificación de la Organización Mundial de la

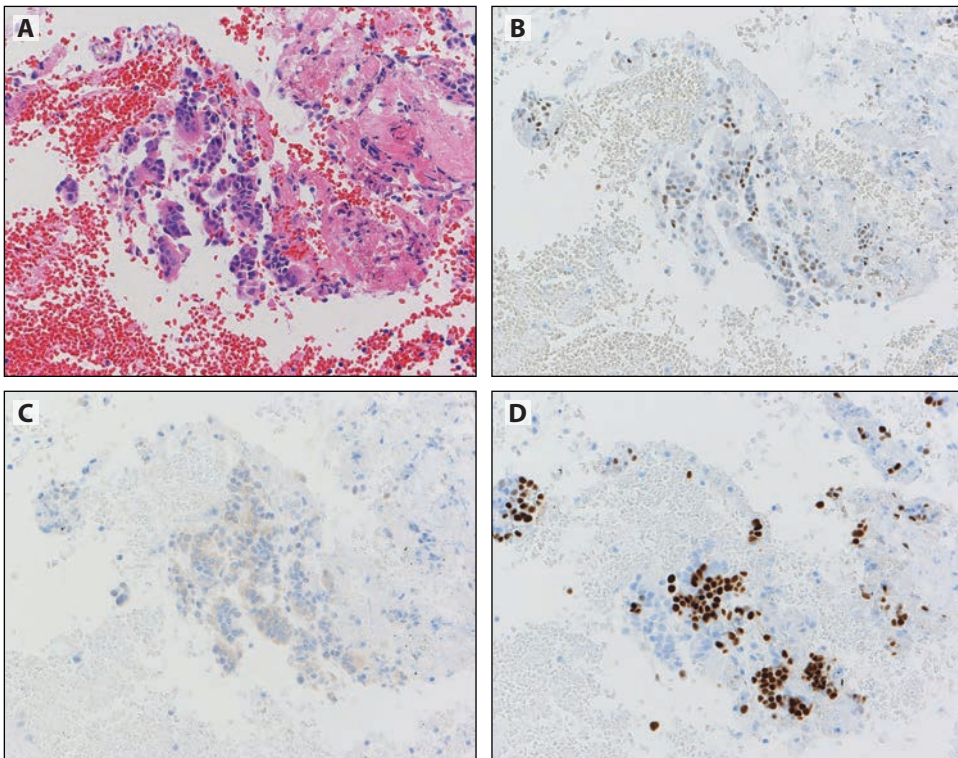


Figura 7-3. (A) Fragmentos de epitelio bronquial no neoplásico (H&E), los cuales son positivos para (B) el clon SPT24, pero negativos para (C) el clon 8G7G3/1. Las células positivas con tinción para (D) p40 se superponen con las células positivas para SPT24, lo que sugiere que las células basales bronquiales reaccionan con el clon SPT24.

Tabla 7-2. Resultados de la expresión de TTF1 de sitios primarios no pulmonares, incluyendo colon y próstata, en tres estudios publicados con los tres clones de TTF1 de uso amplio

		8G7G3/1		SPT24		SP141	
		n	Positivo, n (%)	n	Positivo, n (%)	n	Positivo, n (%)
Vidarsdottir et al., 2018	Carcinoma de colon	166	3 (2 %)	166	7 (4 %)	166	7 (4 %)
Bae et al., 2018	Carcinoma de colon	1319	0 (0 %)	1319	68 (5 %)	1319	68 (5 %)
Prabhakaran et al., 2019	Carcinoma de colon	104	2 (2 %)	104	6 (5,7 %)	104	6 (5,7 %)
Prabhakaran et al., 2019	Carcinoma de próstata	112	6 (5,3 %)	112	31 (28 %)	112	26 (23 %)

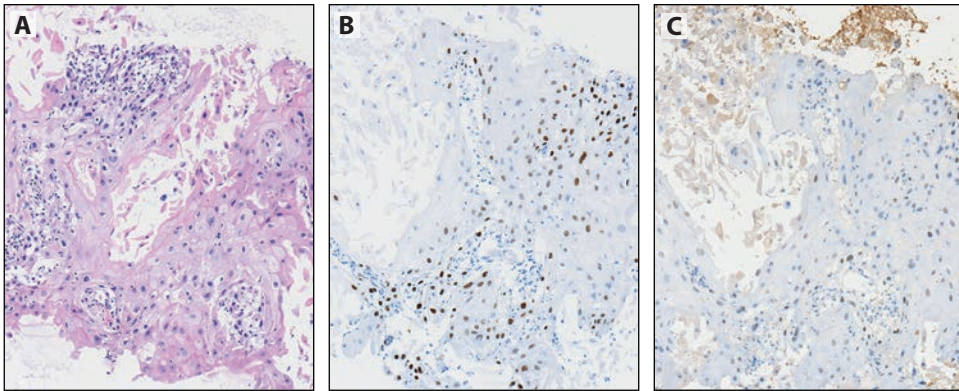


Figura 7-4. (A) Expresión del factor de transcripción tiroideo-1 (TTF1) de acuerdo con los clones del anticuerpo en el carcinoma primario de pulmón de células escamosas. (A) Tinción de H&E que muestra un carcinoma de células escamosas bien diferenciado. (B) Las reacciones positivas con la tinción del clon SPT24 contrastan con la tinción (C) débil o negativa con el clon 8G7G3/1.

Tabla 7-3. Expresión del TTF1 en el carcinoma de pulmón de células escamosas con los tres clones del TTF1 más comúnmente usados

Carcinoma de células escamosas	8G7G3/1		SPT24		SP141	
	n	Positivo, n (%)	n	Positivo, n (%)	n	Positivo, n (%)
Vidarsdottir et al., 2018	201	0 (0 %)	201	12 (6 %)	201	16 (8 %)
Klebe et al., 2016	12	0 (0 %)			12	5 (42 %)
Ordóñez, 2012a	85	0 (0 %)				
Matoso et al., 2010	97	1 (1 %)	97	14 (16,8 %)		
Kadota et al., 2015	449	0 (0 %)	448	27 (6 %)		
Kashima et al., 2014	38	1 (3 %) con EnVision ^a	38	5 (13 %) con EnVision ^b		
	38	4 (11 %) con CSA-II ^c	38	20 (53 %) con CSA-II ^b		

^a EnVision es fabricado por Dako.

^b El estudio comparó directamente el clon 8G7G3/1 y el clon SPT24 en una serie de casos idénticos.

^c CSA-II es fabricado por Roche Tissue Diagnostics.

Salud (OMS) del 2015 (Travis et al., 2015A), estas diferencias en el rendimiento del clon de anticuerpos se han vuelto incluso más importantes (véase el capítulo 6). Debemos observar que un estudio que investigó la expresión de TTF1 en el carcinoma pulmonar de células escamosas encontró un incremento en la positividad de SPT24 usando un sistema de amplificación de señal (el sistema de detección de amplificación catalizada de señal [CSA]-II). El autor de dicho estudio sugiere que existe el potencial de permitir la diferenciación entre los carcinomas pulmonares de células escamosas primarios y las metástasis pulmonares de sitios primarios como la cabeza y el cuello (Kashima et al., 2014). Se requieren más datos antes que este enfoque se pueda usar en la práctica clínica.

En general, las publicaciones disponibles parecen indicar que el clon 8G7G3/1 tiene una mayor especificidad para la detección del adenocarcinoma de pulmón cuando se compara con los clones SP141 y SPT24, tanto en escenarios clinicopatológicos comunes en los que se usa TTF1, entre ellos la distinción del adenocarcinoma de pulmón primario y los adenocarcinomas de sitios diferentes del pulmón, como en el diagnóstico diferencial entre el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma de células escamosas.

Resumen de respuesta

El desempeño de la tinción de TTF1 varía entre los clones. Entre los anticuerpos más utilizados, el 8G7G3/1 es el más específico para identificar el adenocarcinoma de pulmón.

¿Qué grado de tinción del TTF1 se considera un resultado positivo?

En los dos contextos clinicopatológicos comunes que se acaban de mencionar, la positividad focal con TTF1 se considera como una reacción positiva. Sin embargo, esto hace surgir la pregunta sobre la definición de la tinción focal (es decir, el 1 % en comparación con el 10 % y el 50 %, etc.) y si los diferentes clones tienen alguna influencia en este aspecto. Con base en los datos publicados, parece ser que la cantidad de tinción usada para indicar una reacción positiva puede estar determinada por el clon usado de TTF1.

Mediante los clones 8G7G3/1 y SPT24, Smits et al. identificaron que, cuando se usaba el mismo valor de corte para la positividad en ambos clones, había una diferencia significativa entre los clones en todos los valores de corte, lo que tiene como resultado una menor sensibilidad del 8G7G3/1 con valores de corte altos y una menor especificidad del SPT24 con valores de corte bajos (Smits et al., 2015). Luego de determinar el valor de corte óptimo para cada clon (más del 5 % de tinción para el 8G7G3/1 y más del 50 % de tinción para el SPT24), no hubo una diferencia significativa en la sensibilidad (0,79 para el 8G7G3/1 en comparación con 0,82 para el SPT24) o en la especificidad (0,98 para el 8G7G3/1 en comparación con 0,98 para el SPT24) (Smits et al., 2015) (figura 7-5).

En un estudio más reciente (Vidarsdottir et al., 2018) en el cual se investigaron los tres clones de uso más amplio para diferenciar el cáncer de pulmón no escamoso del carcinoma de células escamosas pulmonar y las metástasis pulmonares, el análisis de la curva de características receptor operador (ROC) identificó que el mejor corte para los clones 8G7G3/1 y SPT24 es una tinción del 1 % (área bajo la curva [AUC]) de 0,92 para 8G7G3/1 en comparación con AUC de 0,94 para SPT24), mientras que el mejor corte para el clon SP141 es una tinción del 10 % (AUC de 0,93). Se necesitaron cortes mayores de tinción del 10 % para el SPT24 y tinción del 50 % para el SP141 cuando se realizó el análisis ROC para diferenciar el adenocarcinoma de pulmón de otros carcinomas pulmonares y metástasis al pulmón (AUC de 0,93 para los clones SPT24 y SP141), mientras que la tinción del 1 % siguió siendo el mejor corte para el clon 8G7G3/1 (AUC de 0,93).

Por lo tanto, de acuerdo con estos estudios recientes, la magnitud de la tinción focal indicativa de una reacción positiva con el TTF1 parece variar entre los tres clones de uso más frecuente (figura 7-1). Se necesitan más investigaciones para verificar estos hallazgos, pero parece que el corte óptimo indicativo de una reacción positiva para el clon más específico 8G7G3/1 es mucho menor que los cortes óptimos para los clones más sensibles, SPT24 y SP141. Se recomienda que los patólogos consideren estas diferencias reportadas en los cortes óptimos cuando se elige, utiliza e interpreta un clon particular de TTF1 en el laboratorio, con el fin de garantizar una confiabilidad uniforme para la detección del adenocarcinoma de pulmón en el contexto clínico apropiado. En términos prácticos, cuando se usa el clon 8G7G3/1, cualquier reacción positiva a cualquier nivel de intensidad se puede considerar “positiva”, en particular cuando se usa en muestras pequeñas.

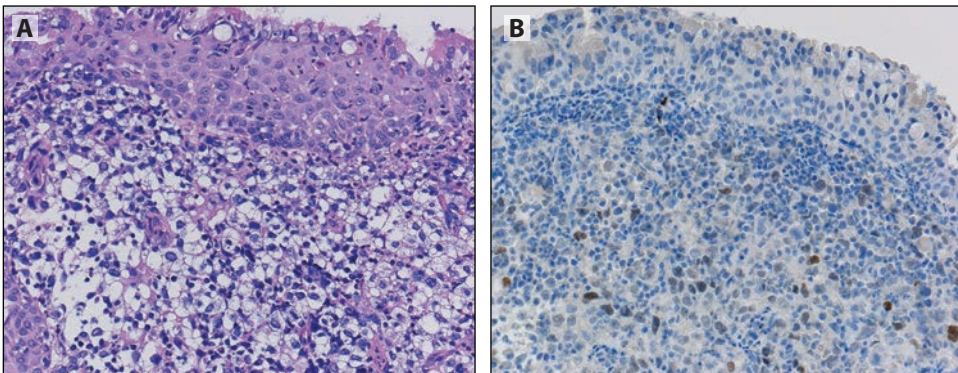


Figura 7-5. (A) Tinción para factor de transcripción tiroideo-1 (TTF1) en el carcinoma poco diferenciado (H&E). (B) Incluso con esta extensión positiva, con el clon 8G7G3/1, esta muestra se debería considerar positiva para TTF1.

Resumen de respuesta

La positividad focal para el TTF1 se considera una reacción positiva que sugiere un adenocarcinoma pulmonar en el contexto clínico adecuado; sin embargo, los valores de corte óptimos varían entre los clones.

¿Existen consideraciones preanalíticas para la inmunotinción de TTF1?

Existen varias consideraciones preanalíticas que se deben tener en cuenta en relación con la inmunotinción para el TTF1, algunas de las cuales merecen mención especial. En un estudio reciente se encontró una tinción reducida o ausente para TTF1 en muestras de citología fijadas a base de alcohol, como CytoLyt, al igual que en las muestras de patología quirúrgica sometidas a agentes descalcificantes como el ácido fórmico o clorhídrico (Gruchy et al., 2015). Esta reducción en la tinción para el TTF1 no se observó en muestras que solo se fijaron con formalina de rutina amortiguada al 10 %. Es importante reconocer que los protocolos de IHQ se deben validar en tejidos de control que se someten a las mismas condiciones preanalíticas que el tejido de prueba, por ejemplo, la fijación a base de alcohol y los tratamientos de descalcificación, incluso cuando se usan soluciones más suaves a base de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los protocolos de IHQ desarrollados para los tejidos fijados en formalina amortiguada al 10 % pueden dar resultados subóptimos cuando se usan en tejidos fijados en alcohol.

A modo de anécdota, se puede observar un gradiente de tinción de la expresión del TTF1 en muestras de adenocarcinoma de pulmón resecaadas quirúrgicamente, lo que implica que una fijación deficiente podría estar relacionada con una detección igualmente deficiente del epítipo para un protocolo de tinción dado.

Resumen de respuesta

Existen algunas consideraciones preanalíticas específicas en relación con la inmunotinción de TTF1, sobre todo en relación con la reducción o ausencia de tinción en muestras preparadas con fijadores a base de alcohol y sometidos a ciertos agentes descalcificadores.

Conclusiones

El rendimiento de tinción del TTF1 es diferente entre los clones de anticuerpos, razón por la cual los patólogos deben estar conscientes de sus características y deben tomar una decisión informada de acuerdo al clon que se usa en el laboratorio. Esto es de suma importancia dada la función central de este marcador en varios aspectos de la clasificación del carcinoma de pulmón, lo que tiene importantes implicaciones terapéuticas.

Referencias

- Bae JM, Kim JH, Park JH, et al. Clinicopathologic and molecular implications of aberrant thyroid transcription factor-1 expression in colorectal carcinomas: an immunohistochemical analysis of 1319 cases using three different antibody clones. *Histopathology*. 2018;72(3):423-432.
- Compérat E, Zhang F, Perrotin C, et al. Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. *Mod Pathol*. 2005;18(10):1371-1376.
- Gruchy JR, Barnes PJ, Dakin Hache KA. CytoLyt fixation and decalcification pretreatments alter antigenicity in normal tissues compared with standard formalin fixation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(4):297-302.
- Kadota K, Nitadori J, Rekhtman N, et al. Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(9):1170-1180.
- Kashima K, Hashimoto H, Nishida H, et al. Significant expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary squamous cell carcinoma detected by SPT24 monoclonal antibody and CSA-II system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(2):119-124.

Klebe S, Swalling A, Jonavicius L, et al. An immunohistochemical comparison of two TTF-1 monoclonal antibodies in atypical squamous lesions and sarcomatoid carcinoma of the lung, and pleural malignant mesothelioma. *J Clin Pathol*. 2016;69(2):136-141.

Matoso A, Singh K, Jacob R, et al. Comparison of thyroid transcription factor-1 expression by 2 monoclonal antibodies in pulmonary and nonpulmonary primary tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(2):142-149.

Ordóñez NG. Thyroid transcription factor-1 is not expressed in squamous cell carcinomas of the lung: an immunohistochemical study with review of the literature. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(6):525-530 (a)

Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(5):429-444. (b)

Pan CC, Chen PC, Tsay SH, et al. Cytoplasmic immunoreactivity for thyroid transcription factor-1 in hepatocellular carcinoma: a comparative immunohistochemical analysis of four commercial antibodies using a tissue array technique. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(3):343-349.

Prabhakaran S, Woo WLW, Xing G, et al. The incidence of labelling of non-lung adenocarcinomas

with antibodies against TTF-1 and diagnostic implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Published online May 23, 2019. doi:10.1097/PAI.0000000000000775

Smits AJ, Vink A, Tolenaars G, et al. Different cutoff values for thyroid transcription factor-1 antibodies in the diagnosis of lung adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(6):416-421.

Tran L, Mattson JS, Nodin B, et al. Various antibody clones of napsin A, thyroid transcription factor 1, and p40 and comparisons with cytokeratin 5 and p63 in histopathologic diagnostics of non-small cell lung carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(9):648-659.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al, eds. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015. (a)

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 WHO classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. (b)

Vidarsdóttir H, Tran L, Nodin B, et al. Comparison of three different TTF-1 clones in resected primary lung cancer and epithelial pulmonary metastases. *Am J Clin Pathol*. 2018;150(6):533-544.

Inmunohistoquímica para p40 y p63 en el cáncer de pulmón

8

Por Teh-Ying Chou y Wendy A. Cooper

Introducción

El gen *p63* es un homólogo del gen supresor tumoral *p53*, el cual se requiere para la proliferación o diferenciación de las poblaciones de células progenitoras necesarias para el desarrollo epitelial (Nobre et al., 2013). El gen *p63* se ubica en el cromosoma 3q27-29, contiene 15 exones y exhibe una notable homología de secuencia y estructural con el gen *p53*. Al igual que *p53*, el gen *p63* codifica un dominio de transactivación N-terminal, un dominio de fijación central de ADN, además de un dominio de carboxi-oligomerización. El P63 se expresa normalmente en los núcleos de las células basales y progenitoras de los epitelios estratificados de la piel, el esófago, las amígdalas, el urotelio, el exocérnix y la vagina, así como en las células basales de las estructuras glandulares del timo, la próstata, la mama y los bronquios (Di Como et al., 2002).

Las isoformas de *p63* consisten en diferentes variantes, las cuales se encuentran en dos grupos principales (TAp63 y Δ Np63) con distintas estructuras en el dominio N-terminal (Nylander et al., 2002). La isoforma TAp63 contiene un dominio TA competente para transactivación con homología para *p53*, el cual regula la expresión de los genes de inhibición del crecimiento. Sin embargo, la isoforma Δ Np63 contiene un dominio Δ N alternativo y transcripcionalmente inactivo, que se cree antagoniza la actividad de TAp63 y *p53*, actuando así como una oncoproteína. El anticuerpo *p63* reconoce las isoformas TAp63 y Δ Np63 y, por lo tanto, es un marcador *pan-63*. En contraste, el anticuerpo para *p40* está dirigido contra la isoforma Δ Np63 y no reconoce la isoforma TAp63.

¿En qué casos se debe utilizar p40 en lugar del p63?

El clon de anticuerpo para *p63* de uso más amplio en los laboratorios de patología es el 4A4, el cual muestra una excelente sensibilidad del 94 % al 100 % para los carcinomas de células escamosas. Sin embargo, la principal limitación de la inmunohistoquímica para *p63* es la baja especificidad debido a la expresión inesperada en el adenocarcinoma de pulmón (16 % al 65 %) y otras neoplasias malignas, como los linfomas de células grandes (hasta el 50 %) (Bishop et al., 2012) y, en pocas oportunidades, algunos tumores de tejidos blandos (Jo y Fletcher, 2011). Aunque la expresión en los tumores no escamosos usualmente es débil a moderada en una minoría de células, en pocos casos se puede observar una expresión fuerte y difusa.

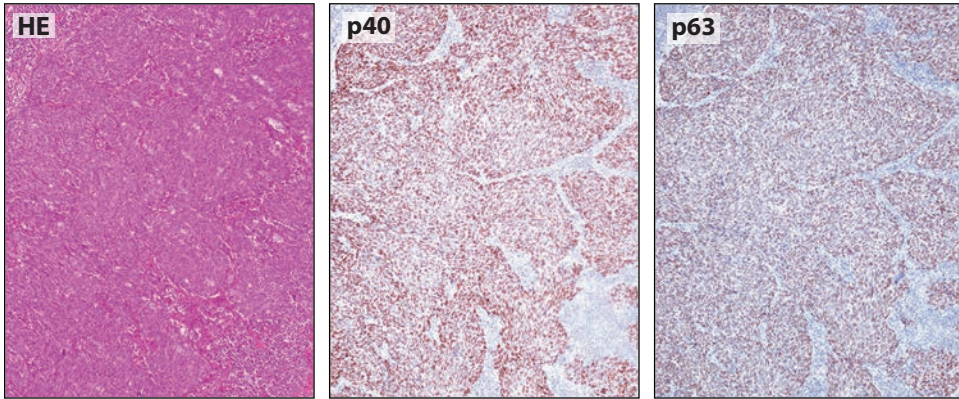


Figura 8-1. Carcinoma de células escamosas poco diferenciado que muestra expresión fuerte y difusa de p40 y p63. HE = hematoxilina-eosina.

Varios estudios han mostrado que p40 tiene una sensibilidad alta comparada con p63, pero tiene mayor especificidad para los carcinomas de células escamosas y es un marcador confiable para la identificación de la diferenciación escamosa ([figuras 8-1](#) y [8-2](#)) (Kriegsmann et al., 2019). En los laboratorios se usan tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales para p40 (clon BC28), y un estudio mostró una sensibilidad y especificidad comparable con alta concordancia entre los anticuerpos policlonales y monoclonales (Tran et al., 2016).

El P40 tiene una mayor precisión que p63 en cuanto a la identificación de los carcinomas de células escamosas. Sin embargo, se debe recordar que si existe evidencia morfológica de diferenciación escamosa en un tumor (queratinización o puentes intercelulares), no se requiere de inmunohistoquímica (IHQ) para confirmarla. En un carcinoma no microcítico de pulmón morfológicamente no diferenciado en una muestra de biopsia pequeña, se debe usar tanto un marcador escamoso como un marcador de adenocarcinoma, en un intento de subtipificar el tumor (por ejemplo, p40 y TTF1). Si hay expresión tanto de p63/p40 como del TTF1 en las mismas células tumorales, la expresión del TTF1 es más importante que la de p63/p40, y aumenta la posibilidad de que el tumor sugiera un adenocarcinoma (Travis et al., 2013). Un estudio indica que la coexpresión del TTF1 y p63 se detecta con frecuencia en adenocarcinomas positivos para quinasa del linfoma anaplásico (ALK), pero no se observa coexpresión del TTF1 y p40 (Sakai et al., 2013).

Resumen de respuesta

El p40 se debe utilizar para la identificación de carcinomas de células escamosas morfológicamente no diferenciados, ya que demuestra una precisión superior a la del p63 en este contexto.

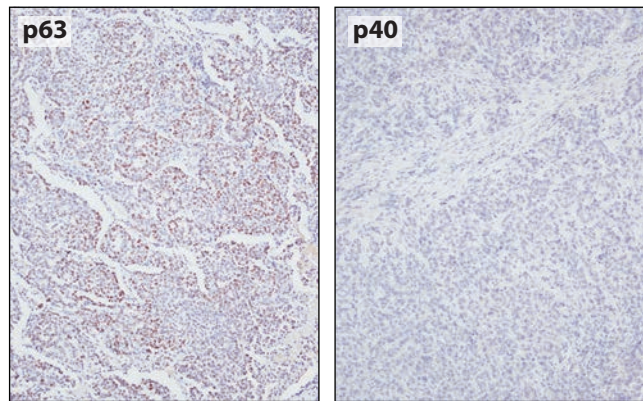


Figura 8-2. P63 no es específico para el carcinoma de células escamosas. Adenocarcinoma de pulmón poco diferenciado que muestra una expresión bastante difusa de p63 y ausencia de expresión de p40.

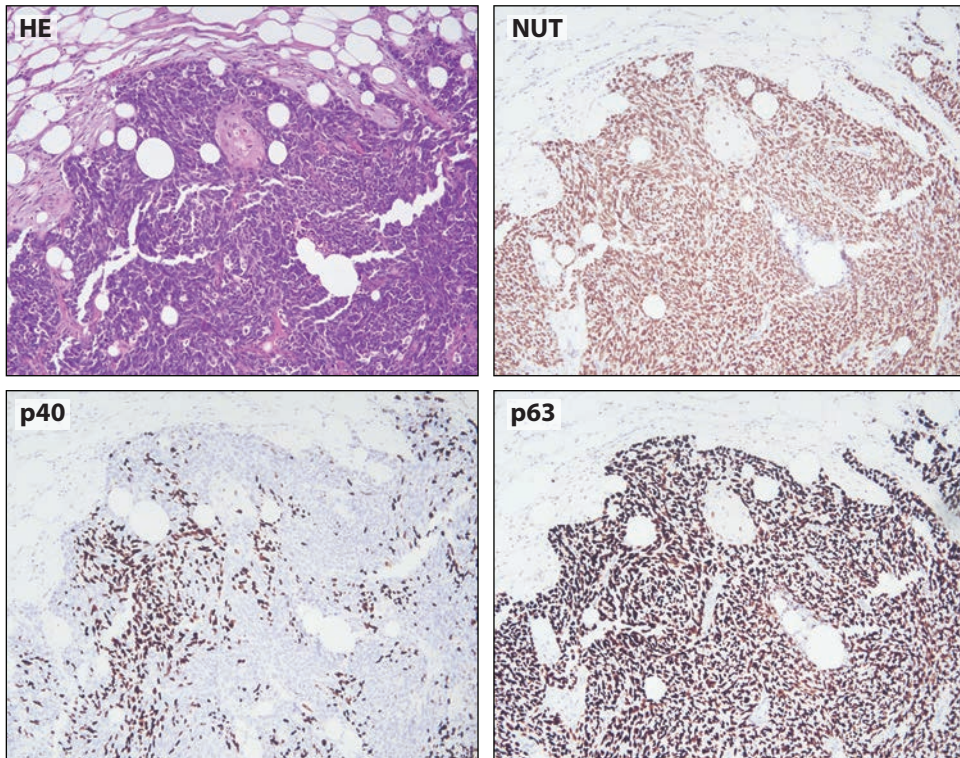


Figura 8-3. Carcinoma de pulmón con proteína nuclear en el testículo (NUT) que muestra expresión focal de p40 y difusa de p63. HE = hematoxilina-eosina.

¿En qué casos se debe utilizar el p63 en lugar del p40?

En algunos casos de carcinoma con proteína nuclear en el testículo (NUT) se observa la expresión discordante entre p63 y p40, con expresión difusa de p63 y pocas células que expresan p40 ([figura 8-3](#)). Esto podría presentar dificultades en el diagnóstico cuando se usa p40, en especial en un contexto de biopsia. Por lo tanto, en casos en donde el carcinoma NUT se incluye como un diagnóstico diferencial, p63 puede ser más útil que p40, además de la evaluación de la morfología y de otros marcadores IHQ (véase el capítulo 14 para obtener más información sobre los carcinomas NUT).

Resumen de respuesta

Si se considera al carcinoma NUT en el diagnóstico diferencial de un tumor, entonces p63 puede ser más útil que p40.

¿Cuál es el alcance de las reacciones positivas de p40/p63 que se debe considerar positivo?

En los carcinomas de células escamosas, es usual que haya una positividad fuerte y difusa para p40 y p63 ([figura 8-1](#)). El valor de corte para p40 y p63 debe ser positivo en más del 50 % de los núcleos tumorales para que se consideren específicos de los carcinomas de células escamosas. La positividad en menos del 10 % de los núcleos no se debe usar para la clasificación diagnóstica por sí sola, ya que se podría observar una positividad focal y débil de p40 o p63 en los adenocarcinomas y en otros tipos de tumores. Un rango del 10 % al 50 % de positividad es digno de consideración y depende del contexto clínico y de la intensidad de

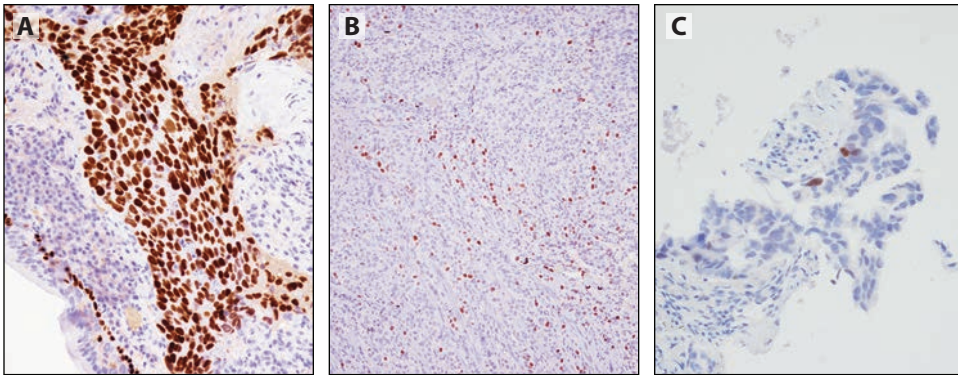


Figura 8-4. Diferentes niveles de expresión de p40 en los carcinomas de pulmón. **(A)** Carcinoma de células escamosas con tinción de p40 fuerte y difusa. **(B)** Adenocarcinoma con tinción nodular en aproximadamente el 10 % de los núcleos. **(C)** Adenocarcinoma con tinción muy focal (<5 % de los núcleos) para p40 únicamente.

la tinción, junto con las características morfológicas y otros hallazgos inmunohistoquímicos ([figura 8-4](#)). Otros marcadores IHQ de diferenciación escamosa como la citoqueratina 5/6 (CK5/6) pueden representar un respaldo útil en casos problemáticos (Loo et al., 2010) (véase el capítulo 9). Cabe anotar que el componente queratinizante de un carcinoma de células escamosas a menudo es negativo para p40 y, por lo tanto, la tinción negativa de este componente no excluye el diagnóstico de carcinoma de células escamosas. No obstante, puesto que la queratinización es un criterio diagnóstico para el carcinoma de células escamosas, no se requiere la inmunotinción para p40 en este contexto.

Resumen de respuesta

Suele haber una fuerte positividad difusa para p40 (y p63) en los carcinomas de células escamosas, y la expresión en al menos el 50 % de los núcleos se debe considerar como un resultado positivo.

Conclusiones

En la práctica cotidiana, si las características morfológicas son insuficientes, p40 es preferible a p63 en la identificación del carcinoma de células escamosas o la diferenciación escamosa ([tabla 8-1](#)).

Tabla 8-1. Estudios comparativos de p40 y p63 para el carcinoma de células escamosas (CCE).

Estudio	Total, n	CCE, n	p40			p63		
			Clon	Sensibilidad, %	Especificidad, %	Clon	Sensibilidad, %	Especificidad, %
Bishop et al., 2012	470	81	5-17	100	98	4A4	100	60
Nonaka, 2012	200	50	p40	100	100	4A4	100	82
Pelosi et al., 2013	141	27	Poli	100	97	4A4	100	78
Ao et al., 2014	154	77	Poli	81	90	4A4	94	80
Koh et al., 2014	184	59	Poli	93	98	7JUL	80	98
Tatsumori et al., 2014	580	158	5-17	97	97	4A4	97	73
Kadota et al., 2015	469	449	5-17	100	85	4A4	100	60
Tran et al., 2016	557	167	BC28	94	96	4A4	95	87
Micke et al., 2016	656	192	BC28	97	98	4A4	97	74
Affandi et al., 2018	70	35	BC28	77	100	DAK-p63	86	63
Kriegsmann et al., 2019	1244	569	BC28	94	97	4A4	94	84

El valor de corte de positividad debe estar basado en la presencia de tinción en más del 50 % de los núcleos tumorales, puesto que una positividad focal o débil no es diagnóstica de carcinoma de células escamosas. En los casos problemáticos, se deben considerar marcadores escamosos adicionales como la CK5/6. La diferenciación entre los carcinomas de células escamosas y otros tipos tumorales también debe tener en cuenta las características morfológicas y otros marcadores IHQ (por ejemplo, el TTF1 en un carcinoma no microcítico [CNM] no diferenciado).

Referencias

- Affandi KA, Tizen NMS, Mustangin M, et al. p40 immunohistochemistry is an excellent marker in primary lung squamous cell carcinoma. *J Pathol Transl Med.* 2018;52(5):283-289.
- Ao MH, Zhang H, Sakowski L, et al. The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2014;45(5):926-934.
- Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, et al. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25(3):405-415.
- Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res.* 2002;8(2):494-501.
- Jo VY, Fletcher CD. P63 immunohistochemical staining is limited in soft tissue tumors. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(5):762-766.
- Kadota K, Nitadori J, Rekhtman N, et al. Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(9):1170-1180.
- Koh J, Go H, Kim MY, et al. A comprehensive immunohistochemistry algorithm for the histological subtyping of small biopsies obtained from non-small cell lung cancers. *Histopathology.* 2014;65(6):868-878.
- Kriegsmann K, Cremer M, Zgorzelski C, et al. Agreement of CK5/6, p40, and p63 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Pathology.* 2019;51(3):240-245.
- Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, et al. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):442-447.
- Micke P, Mattsson JS, Djureinovic D, et al. The impact of the fourth edition of the WHO classification of lung tumours on histological classification of resected pulmonary NSCCs. *J Thorac Oncol.* 2016;11(6):862-872.
- Nobre AR, Albergaria A, Schmitt F. p40: a p63 isoform useful for lung cancer diagnosis—a review of the physiological and pathological role of p63. *Acta Cytol.* 2013;57(1):1-8.
- Nonaka D. A study of Δ Np63 expression in lung non-small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(6):895-899.
- Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol.* 2002;198(4):417-427.
- Pelosi G, Rossi G, Cavazza A, et al. Δ Np63 (p40) distribution inside lung cancer: a driver biomarker approach to tumor characterization. *Int J Surg Pathol.* 2013;21(3):229-239.
- Sakai Y, Nakai T, Ohbayashi C, et al. Immunohistochemical profiling of ALK fusion gene-positive adenocarcinomas of the lung. *Int J Surg Pathol.* 2013;21(5):476-482.
- Tatsumori T, Tsuta K, Masai K, et al. p40 is the best marker for diagnosis pulmonary squamous cell carcinoma: comparison with p63, cytokeratin 5/6, desmocollin-3, and sox2. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(5):377-382.
- Tran L, Mattsson JS, Nodin B, et al. Various antibody clones of napsin A, thyroid transcription factor 1, and p40 and comparisons with cytokeratin 5 and p63 in histopathologic diagnostics of non-small cell lung carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(9):648-659.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(5):668-684.

Marcadores de citoqueratina

9

Por Deepali Jain, Sylvie Lantuejoul, Ming Sound Tsao y Alain C. Borczuk

Introducción

Las citoqueratinas son filamentos intermedios que forman el citoesqueleto de las células epiteliales. Más de 20 tipos de queratinas se expresan en un grupo de queratinas básicas dispuestas en parejas/tipo I (CK1-8) y ácidas/tipo II (CK9-20) (Winter y Schweizer, 1981; Eichner et al., 1985; Ordonez, 2013). Cada categoría está dividida en queratinas de bajo peso molecular (LMW) y de alto peso molecular (HMW). Algunas citoqueratinas se expresan en órganos o tejidos específicos, y su expresión casi siempre se mantiene luego de la transformación neoplásica. La CK1 a la CK6 (básicas) y CK9-17 (ácidas) son queratinas de HMW expresadas en epitelios escamosos y en células epiteliales basales, mientras que las queratinas de LMW son CK7, CK8 (básicas) y CK18-20 (ácidas), y se expresan en el epitelio simple, como los epitelios glandulares (Winter et al., 1980). Puesto que el perfil de expresión de citoqueratinas se utiliza en la práctica clínica para determinar el origen de diversos tumores, en este capítulo se describe el valor de diferentes citoqueratinas para el diagnóstico de los tumores pulmonares.

¿Qué son las tinciones de pancitoqueratina y cuál es su función en el diagnóstico del cáncer de pulmón?

AE1/AE3, KL1, MNF116 y OSCAR son cócteles de anticuerpos que reaccionan con diferentes tipos de queratinas, tanto LMW como HMW. La [tabla 9-1](#) muestra algunos clones de uso común de anticuerpos monoclonales que reaccionan con diferentes tipos de citoqueratinas (Ordonez, 2013). En el pulmón, muestran una positividad citoplasmática difusa en el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas (Tan y Zander, 2008) ([figura 9-1A y B](#)). La expresión perinuclear y puntiforme es característica del carcinoma microcítico ([figura 9-1C y D](#)), pero también se puede identificar una tinción citoplasmática difusa (Thunnissen et al., 2017). Estos cócteles de anticuerpos de pancitoqueratina son útiles cuando el tumor es morfológicamente no diferenciado e implica un diagnóstico diferencial de carcinoma, melanoma, linfoma, mesotelioma y sarcoma ([figura 9-1E y F](#)). La positividad citoplasmática difusa y fuerte de la tinción para queratina prácticamente establece el diagnóstico de carcinoma. La queratina se expresa en un subgrupo que incluye linfoma, sarcoma sinovial, sarcoma epitelioide, angiosarcoma y tumores del músculo liso. En estos casos, se deben realizar otros marcadores específicos del linaje.

Tabla 9-1. Clones de uso común de anticuerpos contra queratinas con su reactividad frente a diversos tipos de queratinas

Clon de anticuerpo	Reactividad a las queratinas
AE1/AE3	CK1-8, 10, 14-16
CAM5.2	CK8, CK7 (en menor medida)
KL1	CK1, K2, CK5-8, CK11, CK14, CK16-K18
Lu5	CK1, CK5, CK6, CK8, CK14, CK18, CK19
MNF116	CK5, 6, 8, 17
OSCAR	CK7, 8, 18 y 19
Pan-CK	CK4-K8, CK10, CK13-CK16, CK18
34βE12	CK1, 5, 10, 14

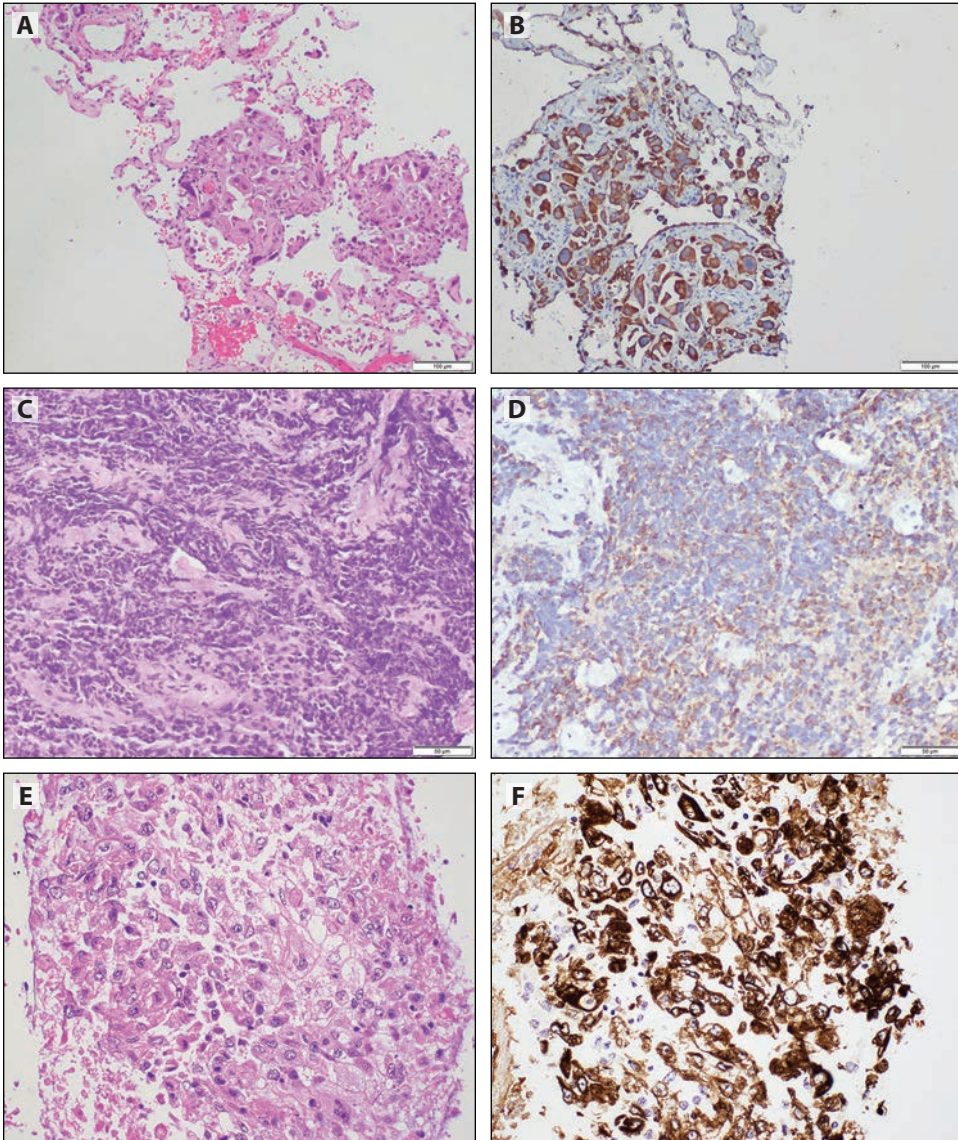


Figura 9-1. Los anticuerpos de pancitoqueratina ayudan a identificar los tumores morfológicamente no diferenciados como carcinoma. **(A y B)** Adenocarcinoma pulmonar, **(C y D)** carcinoma microcítico y **(E y F)** carcinoma no microcítico no diferenciado. **(A, C, E)** Hematoxilina-eosina y **(B, D, F)** panqueratina AE1/AE3.

Resumen de respuesta

Las tinciones de pancitoqueratina permiten establecer el diagnóstico de carcinoma cuando el tumor es morfológicamente no diferenciado.

¿Las citoqueratinas 5 o 5/6 son marcadores sensibles y específicos para el carcinoma de células escamosas del pulmón?

Las citoqueratinas 5 y 6 son proteínas relacionadas; el anticuerpo contra las citoqueratinas 5/6 (CK5/6) detecta ambas, mientras que la CK5 es más específica. La CK5/6 tiñe las células basales (de reserva) bronquiales y bronquiolares con un patrón citoplasmático y membranoso. El anticuerpo contra CK5/6 exhibe una sensibilidad y especificidad global del 98 % y 82 %, respectivamente, para el diagnóstico de carcinoma de células escamosas en muestras quirúrgicas. Sin embargo, la sensibilidad disminuye al 90 %, mientras que la especificidad alcanza el 97 % cuando la tinción es difusa (Rekhtman et al., 2011; Whithaus et al., 2012). Notablemente, la CK5/6 puede ser focal, débil o puede estar ausente en hasta el 25 % de los carcinomas de células escamosas resecaados, y se puede expresar en hasta el 18 % de los adenocarcinomas (Rekhtman et al., 2011). De este modo, los marcadores más sensibles y específicos, como p40, se deben usar para el diagnóstico del carcinoma de células escamosas del pulmón (Wang et al., 2002; Tatsumori et al., 2014; Walia et al., 2017; Jain et al., 2014). Además, CK5/6 también tiñe las células mesoteliales y los mesoteliomas (Ordóñez, 2013; King et al., 2006). Como consecuencia, en una biopsia pleural, la positividad para CK5/6 debe estar respaldada con otras tinciones mesoteliales como la de calretinina, la proteína del tumor de Wilms 1 (WT1) y la negatividad de los marcadores escamosos (34βE12, p40), a fin de establecer un diagnóstico correcto de mesotelioma y carcinoma de células escamosas, respectivamente.

Resumen de respuesta

La CK5/6 no tiene una sensibilidad y especificidad adecuadas, por lo que no se debe utilizar sola para diagnosticar el carcinoma de células escamosas de pulmón.

¿Se debe utilizar la citoqueratina 7 para diferenciar el adenocarcinoma de pulmón del carcinoma de células escamosas?

La citoqueratina 7 (CK7) se expresa en el epitelio bronquial de las vías respiratorias de conducción, el epitelio bronquiolar, los neumocitos tipo I y II, así como en las células club (conocidas previamente como células de Clara). La CK7 también tiñe las glándulas seromucinosas submucosas. El patrón de expresión es citoplasmático. La CK7 tiñe casi todos los adenocarcinomas del pulmón con una sensibilidad de más del 90 % y hasta del 100 % (Chu et al., 2000) ([figura 9-2A-C](#)). Cabe notar que la variante mucinosa muestra positividad en un menor número de casos (50 % al 90 %). No obstante, más de un tercio (Vidarsdottir et al., 2019) de los carcinomas de células escamosas son positivos para CK7, lo que la hace menos específica para la discriminación del linaje dentro del pulmón ([figura 9-2D-F](#)). Por lo tanto, no se recomienda el uso de la CK7 para diferenciar el adenocarcinoma del carcinoma de células escamosas del pulmón. Además, la CK7 no es específica de un origen pulmonar, puesto que se puede identificar en adenocarcinomas de otros sistemas orgánicos, como el tracto pancreatobiliar, el estómago, el ovario y la mama (Chu et al., 2000). En consecuencia, se requiere un panel completo y, lo más importante, que incluya el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y p40 para clasificar los carcinomas no microcíticos, con marcadores adicionales como la napsina A, según sea necesario. El perfil de citoqueratinas es importante en casos difíciles y poco diferenciados, como se mencionó en el apartado anterior.

Resumen de respuesta

La CK7 no se debe utilizar para diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del carcinoma de células escamosas.

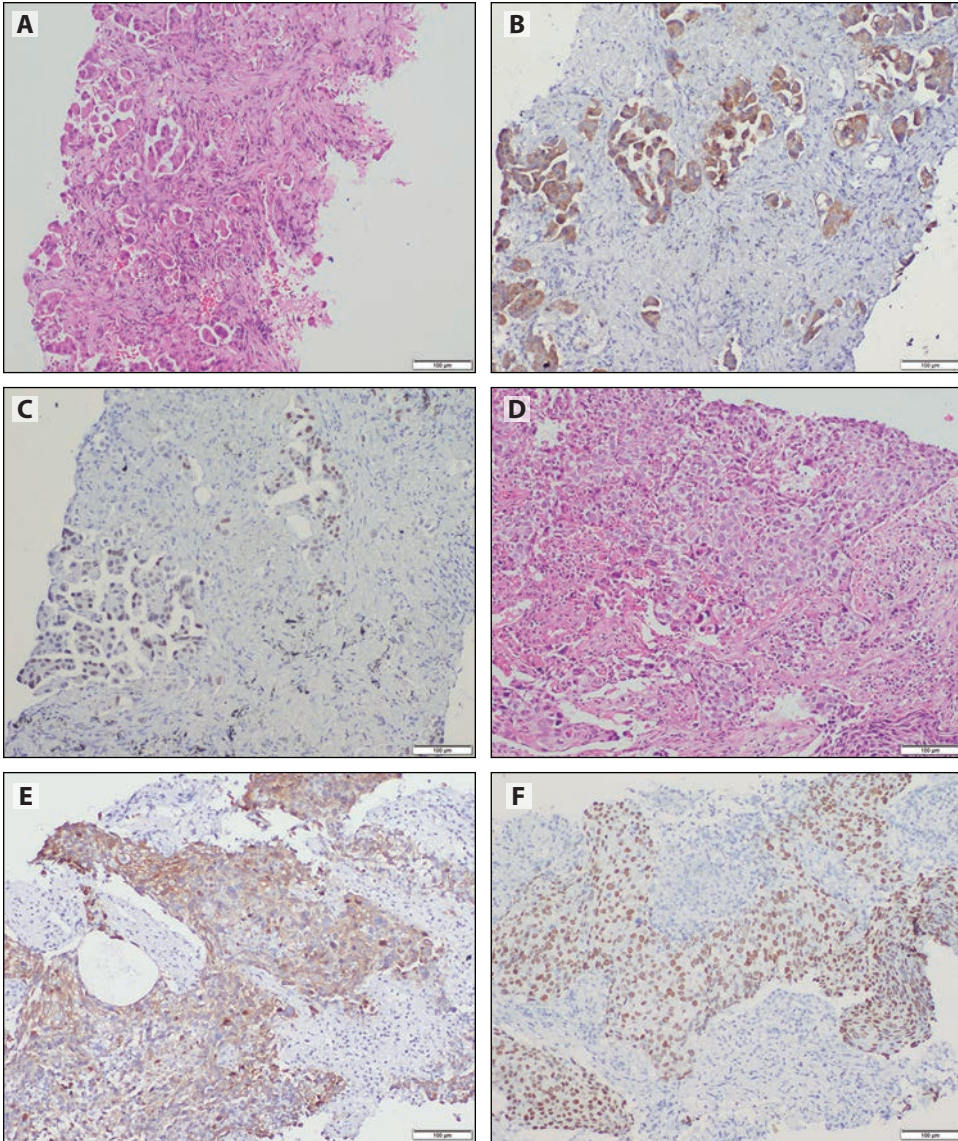


Figura 9-2. La citoqueratina 7 (CK7) no es específica para el adenocarcinoma pulmonar. (A, B, C) Adenocarcinoma y (D, E, F) carcinoma de células escamosas poco diferenciado. (A y D) Hematoxilina-eosina, (B y E) CK7, (C) factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y (F) p40.

¿Se debe considerar como “probable adenocarcinoma” un carcinoma no microcítico difusamente positivo para CK7 pero negativo para TTF1 y p40?

La CK7 no es específica para el adenocarcinoma, ya que puede producir una tinción positiva en el carcinoma de células escamosas. Por ende, no se aconseja el uso de CK7 para la subtipificación del carcinoma no microcítico (Yatabe et al., 2019). Lo mejor es considerar esos carcinomas como carcinomas no microcíticos no especificados (CNM, NOS).

Resumen de respuesta

Por sí sola, la CK7 es insuficiente para establecer un diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar.

¿La CK7 es una tinción útil para diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del mesotelioma?

La CK7 también se puede expresar con fuerza en los mesoteliomas epitelioides; por ello, no es útil para diferenciar los adenocarcinomas de los mesoteliomas (Tot, 2001). Aproximadamente el 90 % de los casos de mesotelioma son positivos para CK7 (Tot, 2001). Es notable la ausencia de la CK7 de la mayoría de los adenocarcinomas de timo, próstata, hepatocelulares y colónicos, así como los carcinomas de células claras renales (Chu et al., 2000) (véase el capítulo 16).

Resumen de respuesta

La CK7 no permite diferenciar el adenocarcinoma de pulmón del mesotelioma maligno.

¿Qué anticuerpo de citoqueratina es preferible para teñir el carcinoma de pulmón microcítico?

CK7 y CK5/6 no son tinciones útiles para el diagnóstico del carcinoma de pulmón microcítico (CPM). La CK7 es negativa o focalmente positiva en el carcinoma microcítico con únicamente la mitad de la tinción del CPM ([figura 9-3](#)) (Chu et al., 2000). La citoqueratina de HMW, como la 34 β E12, es negativa en los tumores neuroendocrinos, como los carcinomas neuroendocrinos microcíticos y de células grandes (Sturm et al., 2001; Zhang et al., 2005; Lyda y Weiss, 2000).

Resumen de respuesta

Se recomienda el uso de los anticuerpos de pancitoqueratina cuando se utilizan para reconocer el CPM.

¿Cuál es la utilidad de la CK20 en el diagnóstico del cáncer de pulmón?

La citoqueratina 20 (CK20) se expresa solo en menos del 5 % del epitelio bronquial normal. El adenocarcinoma mucinoso invasivo, el adenocarcinoma coloide y el entérico, así como otros adenocarcinomas del pulmón con características mucinosas, normalmente coexpresan CK20

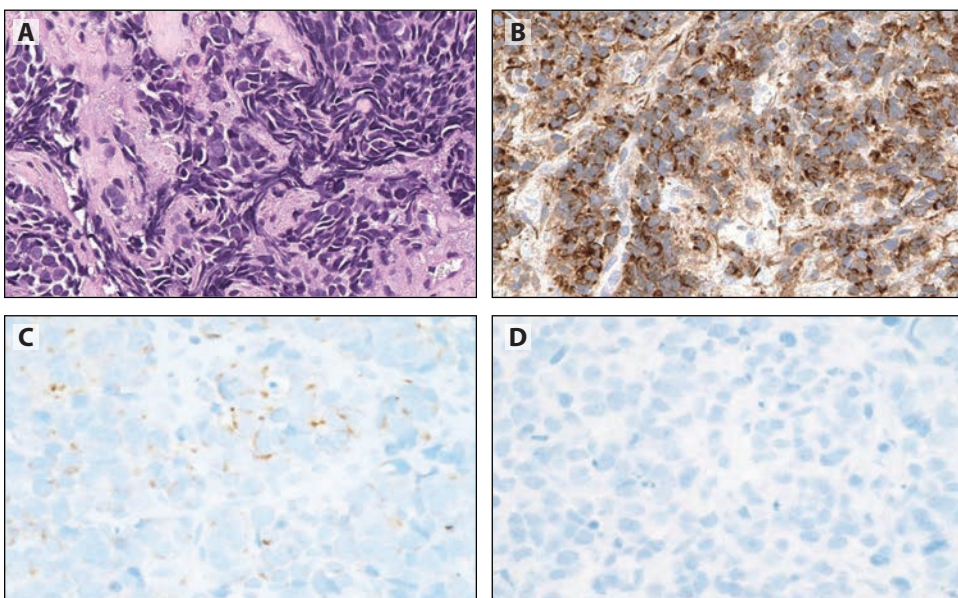


Figura 9-3. El carcinoma microcítico se tiñe mejor con anticuerpos de pancitoqueratina de amplio espectro. (A) Hematoxilina-eosina, (B) AE1/AE3, (C) citoqueratina 7 (CK7) y (D) citoqueratina 5/6 (CK5/6).

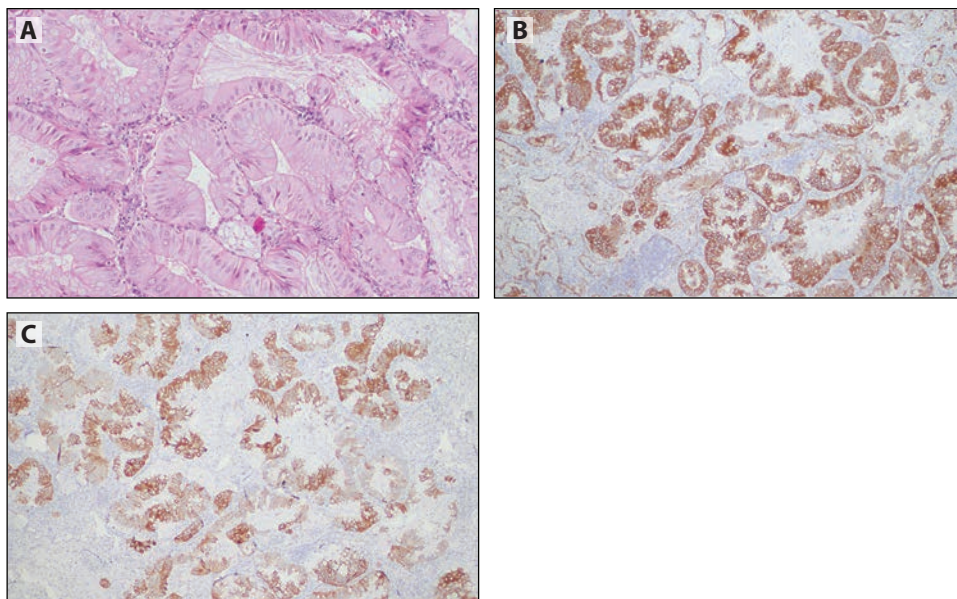


Figura 9-4. El adenocarcinoma mucinoso invasivo pulmonar puede coexpresar citoqueratina 7 (CK7) y citoqueratina 20 (CK20). (A) Hematoxilina-eosina, (B) CK7 y (C) CK20.

junto con CK7 (figura 9-4). La expresión es nodular en más del 90 % de los casos. La CK20 es mayoritariamente negativa en el CPM, con solo un 10 % de los casos positivos (Chu et al., 2000). En estos casos poco comunes de CPM positivos para CK20 se deben realizar otras inmunohistoquímicas (IHQ), como las del TTF1 y la proteína de neurofilamento, a fin de excluir un carcinoma de células de Merkel metastásico (Bobos et al., 2006).

Resumen de respuesta

La positividad de CK20 no excluye el adenocarcinoma mucinoso de origen pulmonar.

¿Qué anticuerpo de citoqueratina se debe utilizar en el caso del mesotelioma?

AE1/AE3, CAM5.2 y MNF116 son útiles para identificar prácticamente todos los mesoteliomas epitelioides y la mayoría de los sarcomatoides (véase también el capítulo 17). Cerca del 5 % al 10 % de los mesoteliomas sarcomatoides son negativos para citoqueratinas de amplio espectro (Attanoos et al., 2000; Klebe et al., 2008). La CK5 o CK5/6 se expresan en el 75 % al 100 % de los mesoteliomas epitelioides; sin embargo, la baja sensibilidad de la CK5/6 en el mesotelioma sarcomatoide limita su uso en el diagnóstico de este último (Cury et al., 2000; Husain et al., 2018).

Resumen de respuesta

La pancitoqueratina y la CK5/6 son útiles en el diagnóstico del mesotelioma, junto con otros marcadores del mesotelioma.

¿Cuál es la función de las citoqueratinas en el diagnóstico del timoma?

Las citoqueratinas tienen una función importante en las biopsias pequeñas de lesiones mediastinales para diferenciar los timomas tipo B de los linfomas, así como los timomas tipo A de los tumores de células fusiformes (véase el capítulo 18). Por lo general, las pancitoqueratinas y la CK19 se expresan tanto en las células epiteliales corticales como en las medulares. Aun así, las CK10 y CK14 están restringidas a las células epiteliales medulares maduras y los corpúsculos

de Hassall. Los timomas tipos A y AB son consistentemente positivos para todas las queratinas ácidas, excepto para CK20. Los timomas tipo B son positivos para las pancitoqueratinas (AE1/AE3), a excepción de la CK20. La CK20 se expresa en adenocarcinomas tímicos poco comunes (Kuo, 2000).

Resumen de respuesta

Las pancitoqueratinas son muy útiles en el diagnóstico diferencial de los timomas con respecto a otras lesiones mediastinales.

Conclusiones

Al ser de origen epitelial, los carcinomas del pulmón expresan todos los tipos de citoqueratinas, por lo que se recomienda la IHQ de las citoqueratinas de amplio espectro en casos de tumores difíciles y poco diferenciados para establecer su origen epitelial. No obstante, debido a la inespecificidad de la mayoría de las queratinas y, a fin de ahorrar tejido tumoral para otras pruebas moleculares, no se aconseja su uso rutinario en biopsias pequeñas de casos de carcinoma de pulmón (tabla 9-2). La CK7 no es útil para diferenciar entre distintos subtipos de carcinomas de pulmón ni para diferenciar los adenocarcinomas de pulmón de los carcinomas metastásicos extrapulmonares. Los carcinomas de células escamosas expresan de manera más específica las queratinas de HMW; sin embargo, un pequeño porcentaje de adenocarcinomas también expresan citoqueratinas de HMW. Los carcinomas microcíticos muestran un patrón perinuclear y puntiforme característico con la pancitoqueratina, pero también se puede observar una tinción citoplasmática difusa. Los CPM comúnmente son negativos para CK5/6, CK7 y CK20. Es importante comprender el patrón y el perfil de las citoqueratinas para su uso prudente en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

Tabla 9-2. Resumen de las citoqueratinas preferidas en el diagnóstico de las neoplasias pulmonares y pleurales

Tumor	Queratinas
Tumor maligno poco diferenciado	Citoqueratinas/pancitoqueratinas de amplio espectro
Carcinoma de células escamosas	CK5, CK5/6, 34βE12
Adenocarcinoma	CK7; véase el texto
Adenocarcinoma mucinoso invasivo	CK7, CK20
Carcinoma microcítico	Citoqueratinas/pancitoqueratinas de amplio espectro
Mesotelioma epitelioide	CK5 o CK5/6
Mesotelioma sarcomatoide	Citoqueratinas/pancitoqueratinas de amplio espectro

Referencias

- Attanoos RL, Dojcinov SD, Webb R, et al. Anti-mesothelial markers in sarcomatoid mesothelioma and other spindle cell neoplasms. *Histopathology*. 2000;37(3):224-231.
- Bobos M, Hytiroglou P, Kostopoulous I, et al. Immunohistochemical distinction between Merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(2):99-104.
- Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*. 2000;13(9):962-972.
- Cury PM, Butcher DN, Fisher C, et al. Value of the mesothelium-associated antibodies thrombomodulin, cytokeratin 5/6, calretinin, and CD44H in distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura. *Mod Pathol*. 2000;13(2):107-112.
- Eichner R, Rew P, Engel A, et al. Human epidermal keratin filaments: studies on their structure and assembly. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;455:381-402.
- Husain AN, Colby TV, Ordonez NG, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma 2017 update of the consensus statement from the

- International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(1):89-108.
- Jain D, Mathur SR, Guleria R, et al. Utility and pattern of positivity of p40 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung by cytology: the first study on fine needle aspiration smears. *Cytopathology.* 2014;25(5):330-335.
- King JE, Thatcher N, Pickering CA, et al. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology.* 2006;48(3):223-232.
- Klebe S, Mahar A, Henderson DW, et al. Malignant mesothelioma with heterologous elements: clinicopathological correlation of 27 cases and literature review. *Mod Pathol.* 2008;21(9):1084-1094.
- Kuo Tt. Cytokeratin profiles of the thymus and thymomas: histogenetic correlations and proposal for a histological classification of thymomas. *Histopathology.* 2000;26(5):403-414.
- Lyda MH, Weiss LM. Immunoreactivity for epithelial and neuroendocrine antibodies are useful in the differential diagnosis of lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2000;31(8):980-987.
- Ordóñez NG. Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. *Hum Pathol.* 2013;44(7):1195-1215.
- Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, et al. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 2011;24(10):1348-1359.
- Sturm N, Lantuejoul S, Laverriere MH, et al. Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34betaE12) expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Hum Pathol.* 2001;32(9):918-925.
- Tan D, Zander DS. Immunohistochemistry for assessment of pulmonary and pleural neoplasms: a review and update. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008;1(1):19-31.
- Tatsumori T, Tsuta K, Msai K, et al. p40 is the best marker for diagnosis pulmonary squamous cell carcinoma: comparison with p63, cytokeratin 5/6, desmocollin-3, and sox2. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(5):377-382.
- Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, et al. The use of immunohistochemistry improves the diagnosis of small cell lung cancer and its differential diagnosis. An international reproducibility study in a demanding set of cases. *J Thorac Oncol.* 2017;12(2):334-346.
- Tot T. The value of cytokeratins 20 and 7 in discriminating metastatic adenocarcinoma from pleural mesotheliomas. *Cancer.* 2001;92(10):2727-2732.
- Vidarsdottir H, Tran L, Nodin B, et al. Immunohistochemical profiles in primary lung cancers and epithelial pulmonary metastases. *Hum Pathol.* 2019;84:221-230.
- Walia R, Jain D, Madan K, et al. p40 & thyroid transcription factor-1 immunohistochemistry: a useful panel to characterize non-small cell lung carcinoma-not otherwise specified (NSCLC-NOS) category. *Indian J Med Res.* 2017;146(1):42-48.
- Wang BY, Gil J, Kaufman D, et al. P63 in pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors. *Hum Pathol.* 2002;33(9):921-926.
- Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, et al. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(2):155-162.
- Winter H, Schweizer J. Carcinoma-specific keratin polypeptide patterns in keratinizing epithelia of rodents: independence of species- and tissue-specific variations. *Carcinogenesis.* 1981;2(7):613-621.
- Winter H, Schweizer J, Goerttler K. Keratins as markers of malignancy in mouse epidermal tumors. *Carcinogenesis.* 1980;1(5):391-398.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practice recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.
- Zhang H, Liu J, Cagle PT, et al. Distinction of pulmonary small cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma: an immunohistochemical approach. *Mod Pathol.* 2005;18(1):111-118.

Marcadores neuroendocrinos

10

Por Mary Beth Beasley, Mauro Papotti y Alain C. Borczuk

Introducción

Las neoplasias neuroendocrinas (NEN) primarias del pulmón incluyen el carcinoide típico (TC) y el carcinoide atípico (AC) de grado bajo e intermedio, así como los carcinomas neuroendocrinos (NEC) de alto grado, el carcinoma neuroendocrino de células grandes (CNECG) y el carcinoma de pulmón microcítico (CPM) (Travis et al., 2015a). Los tumores menos frecuentes, los cuales pueden exhibir diferenciación neuroendocrina (NE), como el carcinoma de línea media con proteína nuclear en el testículo (NUT) (Stathis et al., 2016), el tumor neuroectodérmico primitivo (Weissferdt y Moran, 2012; Marino-Enriquez y Fletcher, 2014) y el tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas (Parkash et al., 1995), también pueden ocurrir en el pulmón (los marcadores inmunitarios para tumores poco comunes se analizan en los capítulos 14 y 15).

Un panel de marcadores NE, entre ellos la cromogranina A, la sinaptofisina y la molécula de adhesión celular neural 1 (NCAM1, conocida también como CD56), contiene los marcadores más recomendados para la identificación de las NEN (Travis et al., 2015a, 2015b; Yatabe et al., 2019). Recientemente, la proteína 1 asociada al insulinoma (INSM1) ha mostrado sensibilidad y especificidad elevadas para el marcado del espectro de las NEN (Mukhopadhyay et al., 2019; Rooper et al., 2017; Rosenbaum et al., 2015). Los marcadores adicionales también podrían ser útiles, según lo discutido en la siguiente sección. No existe un valor de corte claro para ninguno de los marcadores NE con respecto a lo que constituye una tinción inmunohistoquímica (IHQ) positiva, y la interpretación se debe hacer dentro del contexto de las características morfológicas, el tipo de muestra y la extensión de la reacción positiva. Del mismo modo, no hay un consenso sobre si se debe utilizar uno o varios marcadores. En general, la combinación de las características morfológicas NE (anidamiento organoide, estructuras tipo roseta, patrones en palizada) y la tinción positiva para cualquiera de estos marcadores NE sugiere el diagnóstico de una NEN. La extensión y/o intensidad de las reacciones positivas pueden variar entre los subtipos histológicos, y aproximadamente entre el 5 % y el 10 % de los CPM pueden ser negativos para cromogranina, sinaptofisina y CD56. Por el contrario, aproximadamente del 10 % al 20 % de los carcinomas de pulmón no microcíticos (CPNM), es decir, adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas sin morfología NE evidente, exhiben una tinción positiva para uno o más marcadores (Travis et al., 2015a; Yatabe et al., 2019). Dichos tumores se denominan “carcinomas no microcíticos con diferenciación neuroendocrina”;

sin embargo, los estudios no han encontrado este hallazgo relevante con respecto al tratamiento, el resultado o el pronóstico, y dichos tumores se deben manejar y clasificar como CPNM (Travis et al., 2011). En algunas oportunidades, un tumor tiene características morfológicas de diferenciación NE, pero carece de expresión de cromogranina, sinaptofisina o CD56; dichos tumores se denominan “carcinomas no microcíticos con morfología NE” (Travis et al., 2015a).

¿Qué marcadores IHQ son útiles para respaldar la morfología neuroendocrina en la clasificación de las neoplasias neuroendocrinas?

Inmunotinciones neuroendocrinas de uso común

Véase las [figuras 10-1](#) y [10-2](#) para conocer las inmunotinciones NE de uso común.

Cromogranina A y sinaptofisina

La cromogranina A y la sinaptofisina son los verdaderos marcadores de la diferenciación NE. La cromogranina A se encuentra en gránulos centrales densos y la sinaptofisina está presente en vesículas sinápticas. La tinción es citoplasmática para ambos marcadores (Loy et al., 1995). La cromogranina A es positiva entre el 90 % y el 100 % de los TC, entre el 60 % y el 70 % de los AC y CNECG, pero solo en aproximadamente el 25 % de los CPM. La sinaptofisina es positiva en aproximadamente del 70 % al 80 % de las NEN pulmonares, sin importar su grado, pero generalmente es más débil y menos difusa en el NEC de alto grado (Yatabe et al., 2019).

CD56 (NCAM)

La CD56 es más sensible que la cromogranina o la sinaptofisina en el NEC de alto grado en particular, pero es menos específica para la diferenciación de la NE que la cromogranina, la sinaptofisina o la INSM1 (Rooper et al., 2017; Pelosi et al., 2017; Lantuejoul et al., 1998). Es

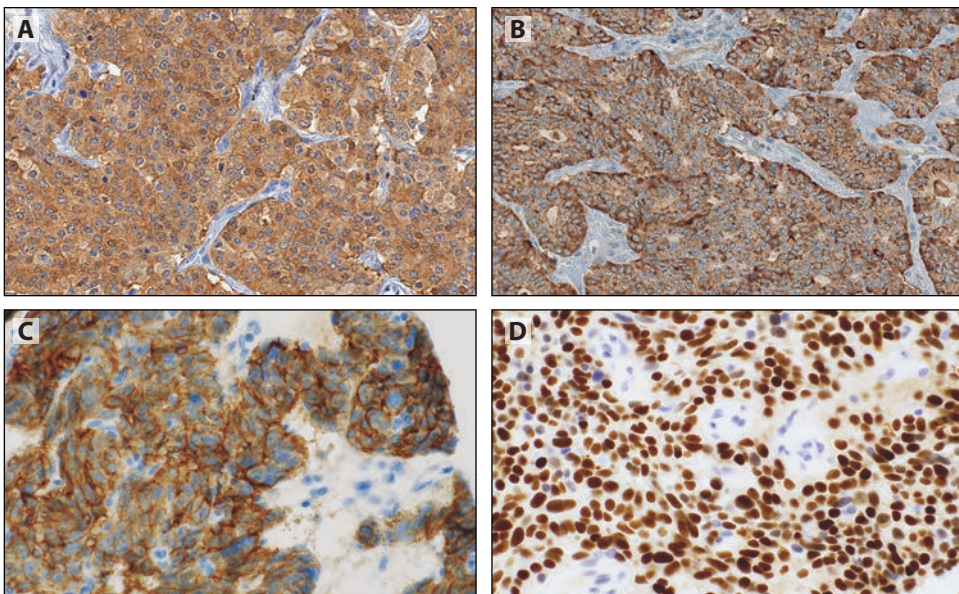


Figura 10-1. Marcadores neuroendocrinos en tumores carcinoides. **(A)** Se observa una inmunorreactividad citoplasmática difusa e intensa para la sinaptofisina, **(B)** cromogranina y **(C)** CD56/NCAM. **(D)** Se observa una tinción nuclear intensa y difusa para la proteína 1 asociada al insulinoma (INSM1).

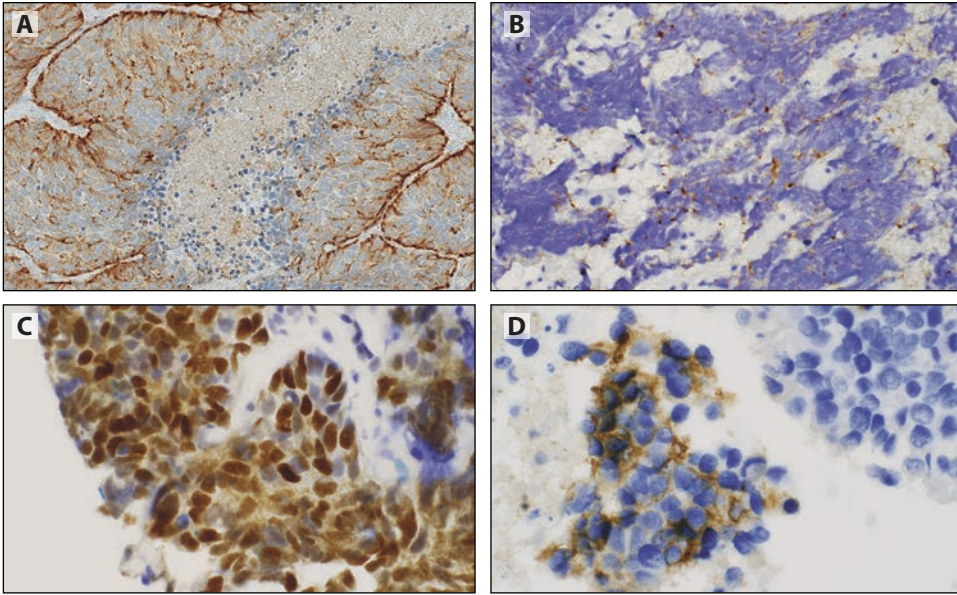


Figura 10-2. Marcadores neuroendocrinos en el carcinoma microcítico. La inmunorreactividad en el carcinoma microcítico para los marcadores neuroendocrinos puede ser más débil y menos uniforme que en los tumores carcinoides. **(A)** La cromogranina es nodular y débil a moderada. **(B)** La sinaptofisina es débilmente perceptible y con patrón “en punto y borde” más que difuso. **(C)** La proteína 1 asociada al insulinooma (INSM1) muestra una tinción nuclear irregular, aunque moderada. **(D)** Tinción citoplasmática y membranosa para CD56.

común que la tinción positiva sea membranosa. La CD56 se puede expresar en diversas células normales, como neuronas, glías y varias células hematopoyéticas (células *natural killer*, células $\gamma\delta$ -T, células T CD8+ activadas y células dendríticas), así como en el músculo esquelético. Además, la CD56 se expresa en hasta el 30 % de los CPNM, así como en algunos tumores mesenquimales, mieloma múltiple, sarcomas y algunos mesoteliomas (Lantuejoul et al., 2000; Agaimy y Wunsch, 2008; Olsen et al., 2006). Por ello, la positividad para la CD56 se debe interpretar en el contexto de la diferenciación epitelial y las características morfológicas NE.

INSM1

Generalmente se ha mostrado que la INSM1 es un marcador altamente sensible y específico para todo el espectro de las NEN. Algunos estudios han mostrado resultados variables en cuanto a si la INSM1 es más o menos sensible y/o específica que la cromogranina, sinaptofisina y/o CD56, o una combinación de las mismas (Kriegsmann et al., 2020). Hasta ahora, la INSM1 ha probado ser un marcador consistentemente confiable, sobre todo en el contexto del CPM, en donde marcadores como la cromogranina pueden ser negativos y la tinción nuclear puede ser muy útil en la interpretación. Además, dada la expresión de CD56 en muchos tipos tumorales, INSM1 puede ser más específico que CD56 (Mukhopadhyay et al., 2019; Nakra et al., 2019; Rooper et al., 2017; Rosenbaum et al., 2015; Roy et al., 2019).

Otros marcadores neuroendocrinos

Se considera que el homólogo 1 de Achaete-scute humano (hASH1) es un marcador de linaje de las células NE debido a que es un determinante nuclear embrionario para la diferenciación NE y, en consecuencia, es altamente específico para las NEN. La sensibilidad general del marcador es baja debido a que el hASH1 se pierde a menudo o se expresa muy poco en los

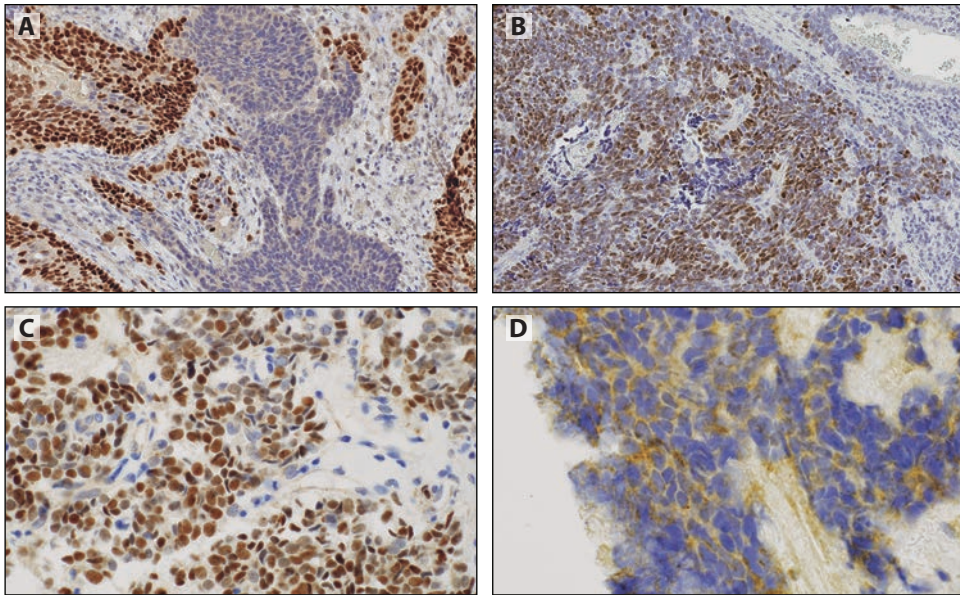


Figura 10-3. Otros marcadores en tumores neuroendocrinos. **(A)** La inmunorreactividad nuclear para p40 resalta el componente escamoso de un carcinoma microcístico combinado con un carcinoma escamoso. **(B)** El homólogo 1 Achaete-scute humano (hASH1) muestra inmunorreactividad nuclear en el carcinoma microcístico. **(C)** La proteína homeobox orthopedia (OTP) muestra una inmunorreactividad nuclear específica en un tumor carcinóide, mientras que **(D)** un carcinoma microcístico solo muestra reactividad citoplasmática inespecífica.

tumores carcinoides; no obstante, se retiene en los tumores de alto grado, en particular en el CPM (Miki et al., 2012; Ye et al., 2016) ([Figura 10-3](#)).

Se considera que la proteína homeobox orthopedia (OTP) juega un papel en el desarrollo del sistema NE hipotalámico. Por lo general, la tinción citoplasmática no es específica, pero se considera que la tinción nuclear es altamente específica para la diferenciación NE (Nonaka et al., 2016). La OTP se expresa de forma preferencial en los tumores carcinoides y solo se expresa en pocas oportunidades en el CPM (Hanley et al., 2018; Viswanathan et al., 2019). A pesar de que la expresión de OTP se ha estudiado de forma extensa en los carcinoides pulmonares, también se ha reportado en tumores NE de otros sitios, entre ellos la próstata y el ovario (Roy et al., 2019), aunque los datos son conflictivos debido a que otros estudios han mostrado una tinción positiva para OTP solo en los tumores NE pulmonares (Nonaka et al., 2016) ([Figura 10-3](#)).

El Leu7 (CD57) tiene cierta utilidad como marcador NE, pero posee una sensibilidad baja y no es específico para la diferenciación NE. De forma similar a la CD56, el Leu7 es positivo en varias células hematopoyéticas y en diversos tumores de la vaina nerviosa, en el timoma de células fusiformes, el sarcoma sinovial y algunos carcinomas tiroideos papilares (Uherova et al., 2003; Miettinen 1993).

La enolasa específica de neuronas (NSE) es sumamente sensible, pero tiene una especificidad muy baja y, por ello, casi nunca se recomienda como un marcador para la evaluación de los NEC pulmonares (Travis et al., 2015a).

Resumen de respuesta

La cromogranina, la sinaptofisina, la CD56 y la INSM1 son marcadores NE útiles para apoyar la morfología NE.

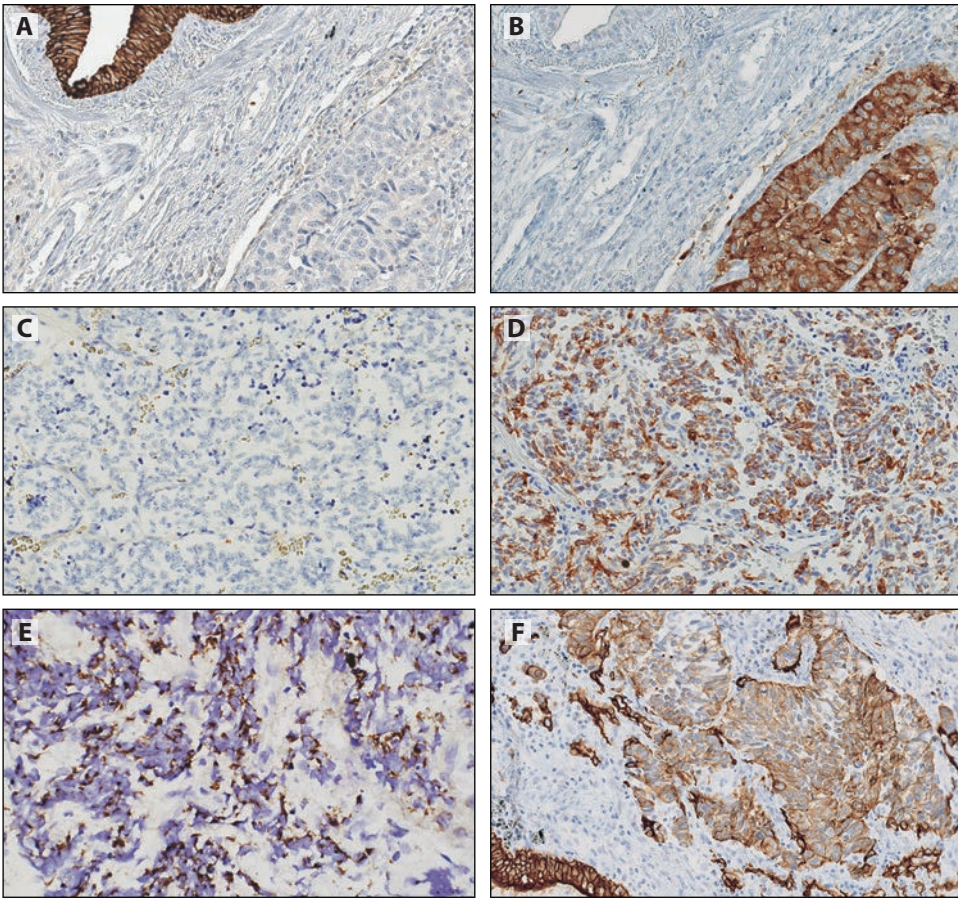


Figura 10-4. Citoqueratina en neoplasias neuroendocrinas. **(A y B)** La citoqueratina de alto peso molecular **(A)** es negativa en este carcinoma neuroendocrino de células grandes, con epitelio positivo en las vías respiratorias, mientras que la **(B)** sinaptofisina resalta el tumor. **(C y D)** Este tumor carcinoide es negativo para el cóctel de citoqueratinas AE1/AE3 **(C)**. Si es necesario en términos del diagnóstico, se puede intentar la determinación de CAM5.2, y un subgrupo de tumores negativos para AE1/AE3 son positivos para CAM5.2 como se muestra en **(D)**. Las tinciones para citoqueratina en el carcinoma microcítico pueden ser puntiformes, como se observa en **(E)**, pero también se puede observar una tinción citoplasmática/membranosa más difusa en **(F)**.

¿Qué marcadores no neuroendocrinos pueden ayudar en la clasificación de los tumores durante el diagnóstico diferencial de las NEN?

Los cócteles amplios de citoqueratinas, como AE1/AE3, y la queratina de bajo peso molecular CAM5.2 (citoqueratina 8 [CK8] y algunas citoqueratinas 7 [CK7]), tiñen la mayoría de las NEN, sin importar el grado ([figura 10-4](#)). Alrededor del 10 % de las NEN son negativas (Rekhtman, 2010), particularmente para AE1/AE3, aunque estos casos se podrían teñir para otras citoqueratinas como CAM5.2. Por lo general, el CPM muestra un patrón de tinción tipo “borde y punto” con las citoqueratinas, en particular con CAM5.2 (Travis et al., 2015a). Aunque la CK7 puede ser positiva en un número variable de NEN pulmonares, una tinción positiva para CK20 sugiere la posibilidad de un carcinoma de células de Merkel (Cheuk et al., 2001). Las citoqueratinas de alto peso molecular, como CK34βE12, casi siempre son negativas en la NEN pulmonar, y una tinción positiva en presencia de marcadores NE negativos habitualmente indica un carcinoma basaloide de células escamosas, cuya morfología puede imitar de cerca a los NEC de alto grado (Sturm et al., 2001, 2003). La tinción positiva y difusa con p40 o p63 respalda el diagnóstico de carcinoma de células escamosas en este

escenario. Un pequeño porcentaje de NEC de alto grado puede mostrar tinción focal para p63 y menos frecuentemente para p40, pero la tinción no debe ser difusa (Rekhtman et al., 2016) ([Figura 10-4](#)).

Resumen de respuesta

La panqueratina y las queratinas de bajo peso molecular, más que las queratinas de alto peso molecular, deben ser positivas en las NEN.

¿Cuándo se deben aplicar los marcadores NE a un carcinoma no microcítico?

Los marcadores IHQ NE solo se deben utilizar cuando estén presentes las características morfológicas de la diferenciación NE. Como se estableció con anterioridad, un porcentaje variable de CPNM puede ser positivo para marcadores NE en ausencia de morfología NE (carcinoma no microcítico con diferenciación NE) ([figura 10-5](#)). Por ello, debido a la carencia de datos que apoyen la relevancia clínica de los marcadores NE positivos en ausencia de morfología NE, casi nunca se recomienda utilizar marcadores NE en tumores que carecen de morfología NE. Como se señaló antes, en algunas oportunidades los tumores pueden mostrar morfología NE pero carecen de tinción con cromogranina, sinaptofisina o CD56 (carcinoma no microcítico con morfología NE) (Travis et al., 2015a, 2015b; Yatabe et al., 2019; Rekhtman, 2010; Zacharias et al., 2003). Añadir INSM1 puede resolver este problema, al menos en algunos de estos tumores, pero se requiere de más estudios para determinar si se debe añadir a casos difíciles ([figura 10-6](#)).

En el contexto de una biopsia pequeña o muestras de citología, puede ser más difícil diferenciar las características morfológicas NE, y hacer un diagnóstico definitivo de CNECG en una biopsia pequeña puede ser particularmente problemático. En la actualidad, si se detecta

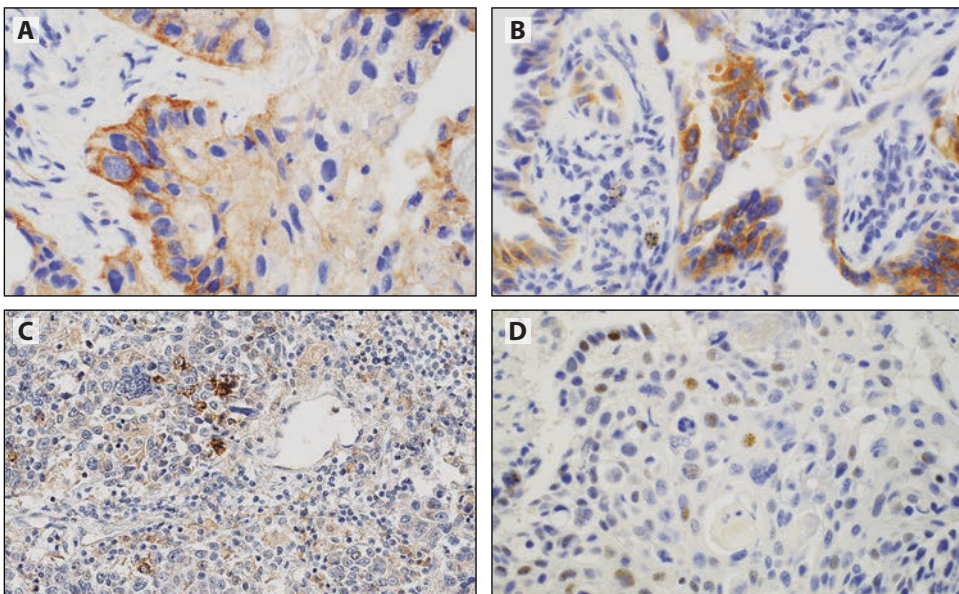


Figura 10-5. Marcadores neuroendocrinos en carcinoma no microcítico no neuroendocrino (carcinoma no microcítico con diferenciación NE). **(A)** Un carcinoma de células escamosas es moderado y multifocalmente inmunorreactivo para CD56. **(B)** Un adenocarcinoma con reactividad multifocal para sinaptofisina. **(C)** Se observa reactividad focal a la cromogranina en un carcinoma de células grandes. **(D)** La proteína 1 asociada al insulinoma (INSM1) muestra una tinción débil y focal en un carcinoma de células escamosas.

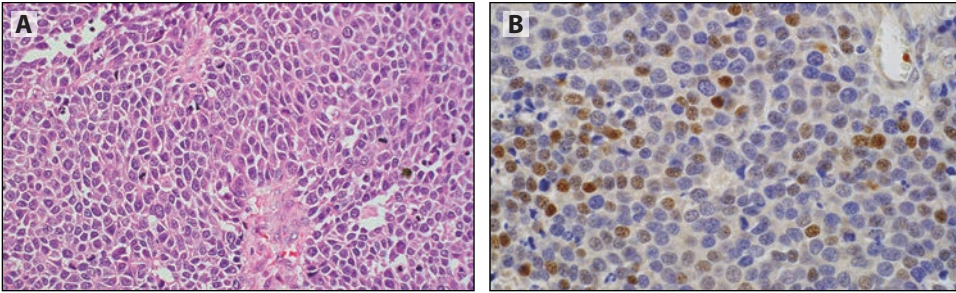


Figura 10-6. Carcinoma no microcítico con morfología neuroendocrina. **(A)** El tumor fue diagnosticado previamente como un carcinoma no microcítico con morfología neuroendocrina luego de una tinción negativa para CD56, cromogranina y sinaptofisina. Recientemente, **(B)** el uso de proteína 1 asociada al insulinooma (INSM1) permitió la reclasificación como un carcinoma neuroendocrino de células grandes.

una tinción positiva para marcadores NE en un CPNM y hay morfología NE, se recomienda realizar un diagnóstico de “carcinoma no microcítico (CNM) que sugiere CNECG” (Travis et al., 2015a). Si el tumor carece de morfología NE, se recomienda realizar un diagnóstico de CNM con un comentario con respecto a la tinción NE positiva. Puesto que la mayoría de los cánceres de pulmón se diagnostican en una biopsia pequeña o en una citología, la dificultad para identificar de forma correcta el CNECG en una biopsia pequeña es compleja dadas las diferencias potenciales en las estrategias de tratamiento en comparación con otros CPNM (Travis et al., 2015a). Es posible que no haya una morfología NE evidente en biopsias pequeñas de CNECG, y se ha mostrado que su presencia se correlaciona con el tamaño de la biopsia. Se ha mostrado también que la tinción positiva con dos o tres marcadores NE (cromogranina, sinaptofisina, CD56) tiene una sensibilidad del 80 % y una especificidad del 99 % según un estudio de Derks et al. (2019). Se requiere de más estudios para verificar este hecho, así como el impacto de la adición de INSM1 al algoritmo.

Por lo general, el diagnóstico de los tumores carcinoides es sencillo en biopsias pequeñas; aun así, es posible que no haya figuras mitóticas y necrosis en los TC y AC, por lo que la subtipificación se realiza de forma preferencial en una muestra resecada. El papel del marcador proliferativo Ki-67 se analiza en detalle en el capítulo 11, pero actualmente el Ki-67 no tiene un papel en la discriminación entre los TC y los AC. Sin embargo, el Ki-67 es útil en biopsias pequeñas para discriminar a los NEC de alto grado y los tumores carcinoides, en especial cuando la morfología es subóptima (Travis et al., 2015a; Pelosi et al., 2014, 2017).

Resumen de respuesta

Los marcadores NE solo se deben utilizar cuando estén presentes las características morfológicas de diferenciación NE. En muestras pequeñas en las que la morfología NE es difícil de evaluar, podría haber una mayor especificidad cuando 2 o más marcadores son positivos.

Conclusiones

En tumores con morfología NE, los marcadores IHQ útiles para confirmar la diferenciación NE consisten en una combinación de cromogranina, sinaptofisina, CD56 e INSM1. En los tumores de alto grado, los marcadores pueden ser más focales o estar ausentes, por lo que podría ser necesaria una combinación de marcadores. En muestras pequeñas en donde puede ser difícil evaluar la morfología NE, dos marcadores positivos pueden ser más específicos que marcadores aislados. En casos difíciles, una combinación de citoqueratina de alto peso molecular, queratina de bajo peso molecular y p63/p40 puede ayudar al diagnóstico diferencial con los imitadores morfológicos no NE.

Referencias

- Agaimy A, Wunsch PH. Distribution of neural cell adhesion molecule (NCAM/CD56) in gastrointestinal stromal tumors and their intra-abdominal mesenchymal mimics. *J Clin Pathol*. 2008;61(4):499-503.
- Cheuk W, Kwan MY, Suster S, et al. Immunostaining for thyroid transcription factor 1 and cytokeratin 20 aids the distinction of small cell carcinoma from Merkel cell carcinoma, but not pulmonary from extrapulmonary small cell carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(2):228-231.
- Derks JL, Dingemans AC, van Suylen RJ, et al. IS the sum of positive neuroendocrine immunohistochemical stains useful for diagnosis of large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) on biopsy specimens? *Histopathology*. 2019;74(4):555-566.
- Hanley KZ, Dureau ZJ, Cohen C, et al. Orthopedia homeobox is preferentially expressed in typical carcinoids of the lung. *Cancer Cytopathol*. 2018;126(4):236-242.
- Kriegsmann K, Zgorzelski C, Kazdal D, et al. Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) in thoracic tumors is less sensitive but more specific compared with synaptophysin, chromogranin A, and CD56. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2020;28(3):237-242.
- Lantuejoul S, Laverriere MH, Strum N, et al. NCAM (neural cell adhesion molecules) expression in malignant mesotheliomas. *Hum Pathol*. 2000;31(4):415-421.
- Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, et al. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(10):1267-1276.
- Loy TS, Darkow GV, Quesenberry JT. Immunostaining in the diagnosis of pulmonary neuroendocrine carcinomas. An immunohistochemical study with ultrastructural correlations. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(2):173-182.
- Marino-Enriquez A, Fletcher CD. Round cell sarcomas—biologically important refinements in subclassification. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;53:493-504.
- Miettinen M. Immunohistochemistry in tumour diagnosis. *Ann Med*. 1993;25(3):221-233.
- Miki M, Ball DW, Linnoila RI. Insights into the achaete-scute homolog-1 gene (hASH1) in normal and neoplastic human lung. *Lung Cancer*. 2012;75(1):58-65.
- Mukhopadhyay S, Dermawan JK, Lanigan CP, et al. Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a sensitive and highly specific marker of neuroendocrine differentiation in primary lung neoplasms: An immunohistochemical study of 345 cases, including 292 whole-tissue sections. *Mod Pathol*. 2019;32(1):100-109.
- Nakra T, Nambirajan A, Guleria P, et al. Insulinoma-associated protein 1 is a robust nuclear immunostain for the diagnosis of small cell lung carcinoma in cytology smears. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(8):539-548.
- Nonaka D, Papaxoinis G, Mansoor W. Diagnostic utility of orthopedia homeobox (OTP) in pulmonary carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(6):738-744.
- Olsen SH, Thomas DG, Lucas DR. Cluster analysis of immunohistochemical profiles in synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, and Ewing sarcoma. *Mod Pathol*. 2006;19(5):659-668.
- Parkash V, Gerald WL, Parma A, et al. Desmoplastic small round cell tumor of the pleura. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(6):659-665.
- Pelosi G, Rindi G, Travis WD, et al. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol*. 2014;9(3):273-284.
- Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(5):513-529.
- Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(11):1628-1638.
- Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, et al. Next-generation sequencing of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma reveals small cell carcinoma-like non-small cell carcinoma-like subsets. *Clin Cancer Res*. 2016;22(14):3618-3629.
- Rooper LM, Sharma R, Li QK, et al. INSM1 demonstrates superior performance to the individual combined use of synaptophysin, chromogranin and CD56 for diagnosing neuroendocrine tumors of the thoracic cavity. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1561-1569.
- Rosenbaum JN, Guo Z, Baus RM, et al. INSM1: a novel immunohistochemical and molecular marker for neuroendocrine and neuroepithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(4):579-591.
- Roy M, Buehler DG, Zhang R, et al. Expression of insulinoma-associated protein 1 (INSM1) and orthopedia homeobox (OTP) in tumors with neuroendocrine differentiation at rate sites. *Endocr Pathol*. 2019;30(1):35-42.
- Stathis A, Zucca E, Bekradda M, et al. Clinical response of carcinomas harboring the BRD4-NUT oncoprotein to the targeted bromodomain inhibitor OTX015/MK-8628. *Cancer Discov*. 2016;6(5):492-500.
- Sturm N, Lantuejoul S, Laverriere MH, et al. Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34betaE12) expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Hum Pathol*. 2001;32(9):918-925.
- Sturm N, Rossi G, Lantuejoul S, et al. 34BetaE12 expression along the whole spectrum of neuroendocrine proliferations of the lung, from neuroendocrine cell

- hyperplasia to small cell carcinoma. *Histopathology*. 2003;42(2):156-166.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. *WHO Classification of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015. (a)
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. (b)
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-285.
- Uherova P, Valdez R, Ross CW, et al. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. An immunophenotypic reappraisal based on a single-institution experience. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(2):192-198.
- Viswanathan K, Borczuk AC, Siddiqui MT. Orthopedia homeobox protein (OPT) is a sensitive and specific marker for primary pulmonary carcinoid tumors in cytologic and surgical specimens. *J Am Soc Cytopathol*. 2019;8(1):39-46.
- Weissferdt A, Moran CA. Primary pulmonary primitive neuroectodermal tumor (PNET): a clinicopathological and immunohistochemical study of six cases. *Lung*. 2012;190(6):677-683.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.
- Ye B, Cappel J, Findeis-Hosey J, et al. hASH1 is a specific immunohistochemical marker for lung neuroendocrine tumors. *Hum Pathol*. 2016;48:142-147.
- Zacharias J, Nicholson AG, Ladas GP, et al. Large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinomas with neuroendocrine morphology of the lung: prognosis after complete resection and systematic nodal dissection. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(2):348-352.

Marcadores de proliferación

11

Por Fernando Lopez-Rios, Masayuki Noguchi y Wendy A. Cooper

Introducción

Existen muchos marcadores asociados a la proliferación o la regulación del ciclo celular como Ki-67, el antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA), la topoisomerasa, el MCM y la proteína transformadora 2 de célula epitelial (ECT2). Entre ellos, la tinción inmunohistoquímica para Ki-67 es un método ampliamente usado para estimar la actividad proliferativa de los tumores. La Ki-67 es una proteína ligante de ADN, la cual es codificada por el gen *MKI67* ubicado en el cromosoma 10 en los humanos. La Ki-67 se expresa en todas las fases activas del ciclo celular, pero no en la fase G_0 (Chirieac, 2016; Rekhtman et al., 2019a).

¿Cuándo se debe utilizar un marcador de proliferación en el diagnóstico?

Aunque la evaluación de la tasa de proliferación de la Ki-67 puede ayudar a confirmar un tumor sumamente proliferativo, la Ki-67 no es necesaria para la evaluación de los criterios diagnósticos en los tumores torácicos primarios. La evaluación del conteo mitótico es necesaria para categorizar y clasificar los tumores neuroendocrinos pulmonares, pero a veces puede ser difícil de estudiar, en particular en biopsias pequeñas y trituradas o en muestras de citología subóptimas. En estos casos, un marcador proliferativo como la Ki-67 puede ser útil para diferenciar los tumores carcinoides de los carcinomas neuroendocrinos de alto grado (carcinomas neuroendocrinos de alto grado y carcinomas microcíticos) (Yatabe et al., 2019) ([figura 11-1](#)). Se ha sugerido un umbral de índice de proliferación para la Ki-67 del 20 % como el límite superior para los tumores carcinoides atípicos (Travis et al., 2015) y del 40 % al 50 % como el límite inferior para los carcinomas neuroendocrinos de alto grado (Yatabe et al., 2019). Sin embargo, desde un punto de vista práctico, es usual que los carcinomas microcíticos exhiban índices de proliferación para la Ki-67 muy altos, del 50 % al 100 % (Travis et al., 2015; Rekhtman, 2010) ([figura 11-2](#)).

Resumen de respuesta

Un marcador de proliferación, como Ki-67, puede ser útil en pequeñas biopsias trituradas o muestras de citología para ayudar a diferenciar los tumores carcinoides de los carcinomas neuroendocrinos de alto grado, ya que las células trituradas mal conservadas pueden simular tumores

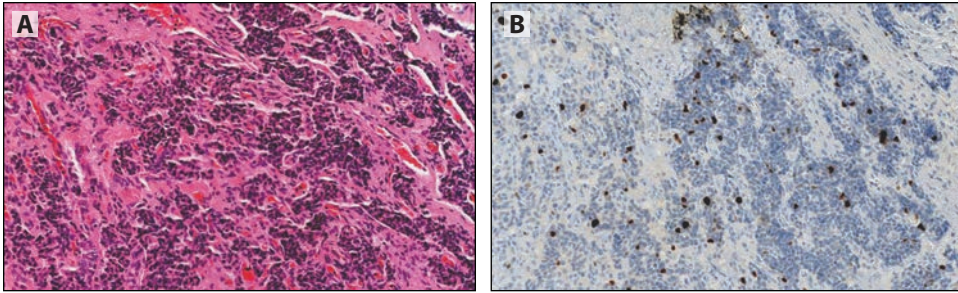


Figura 11-1. Tinción para Ki-67 que muestra un índice de proliferación bajo que puede ayudar a identificar tumores carcinoides en biopsias trituradas, los cuales pueden imitar morfológicamente a los tumores neuroendocrinos de alto grado: **(A)** H&E, $\times 400$; **(B)** Ki-67, $\times 400$.

de alto grado. Los marcadores de proliferación no son necesarios en la evaluación diagnóstica rutinaria de los tumores neuroendocrinos torácicos primarios o de cualquier otro tumor torácico.

¿Cuál es la función de la Ki-67 en la diferenciación de los tumores carcinoides típicos y atípicos?

En los tumores carcinoides pulmonares (y en los tímicos), se usa la evaluación de la tasa mitótica y la presencia o ausencia de necrosis para diferenciar los tumores carcinoides típicos de los atípicos, de acuerdo con la clasificación que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el 2015 (Travis et al., 2015). Esta clasificación no requiere de la Ki-67 para diagnosticar ni clasificar los tumores neuroendocrinos torácicos. Aunque esto es algo controversial debido a que la Ki-67 se usa para la evaluación de rutina de los tumores neuroendocrinos enteropancreáticos (Marchevsky et al., 2018; Naheed et al., 2019), la biología de los tumores neuroendocrinos que surgen en diferentes ubicaciones anatómicas no es necesariamente la misma (Pelosi et al., 2014), y no se cuenta con suficientes datos para apoyar el uso de la Ki-67 en el diagnóstico de los tumores neuroendocrinos pulmonares. Los tumores carcinoides pueden mostrar un rango de tinción para la Ki-67 (y existen algunos datos que indican un rango del índice de proliferación para la Ki-67 del 2,3 % al 4,15 % observado en los tumores carcinoides típicos, así como del 9 % al 17,8 % en los tumores carcinoides atípicos) (Pelosi et al., 2014). Recientemente, algunas divisiones tripartitas de tumores carcinoides pulmonares que usan el índice de marcado para la Ki-67 por sí sola ($<10\%$, entre el 10% y el 19% , y $\geq 20\%$) o combinada con histología (carcinoides típicos con Ki-67 $<5\%$, carcinoides típicos con Ki-67 $\geq 5\%$ y carcinoides atípicos) se han asociado con el pronóstico (Marchevsky et al., 2018; Pelosi et al., 2019). En un estudio reciente de 165 tumores carcinoides, se encontró que el índice de Ki-67 (evaluado con un algoritmo digital) aumentó significativamente en los carcinoides atípicos en comparación con los típicos, y fue el único factor pronóstico significativo de recurrencia de la enfermedad en la cohorte (Dermawan y Farver, 2020).

Resumen de respuesta

Actualmente no hay una función establecida para la evaluación de rutina de la Ki-67 en la distinción entre los tumores carcinoides típicos y los atípicos.

¿Qué nivel de concordancia existe entre el índice de proliferación en las muestras de biopsia y las muestras quirúrgicas?

La mayor parte de la evidencia disponible en la comparación del índice de proliferación en diferentes tipos de muestras se relaciona con los tumores carcinoides. El índice de proliferación en los tumores carcinoides puede diferir entre las biopsias pequeñas y las muestras por resección ([figura 11-3](#)). El nivel de concordancia es controversial, relacionado en parte con la falta de

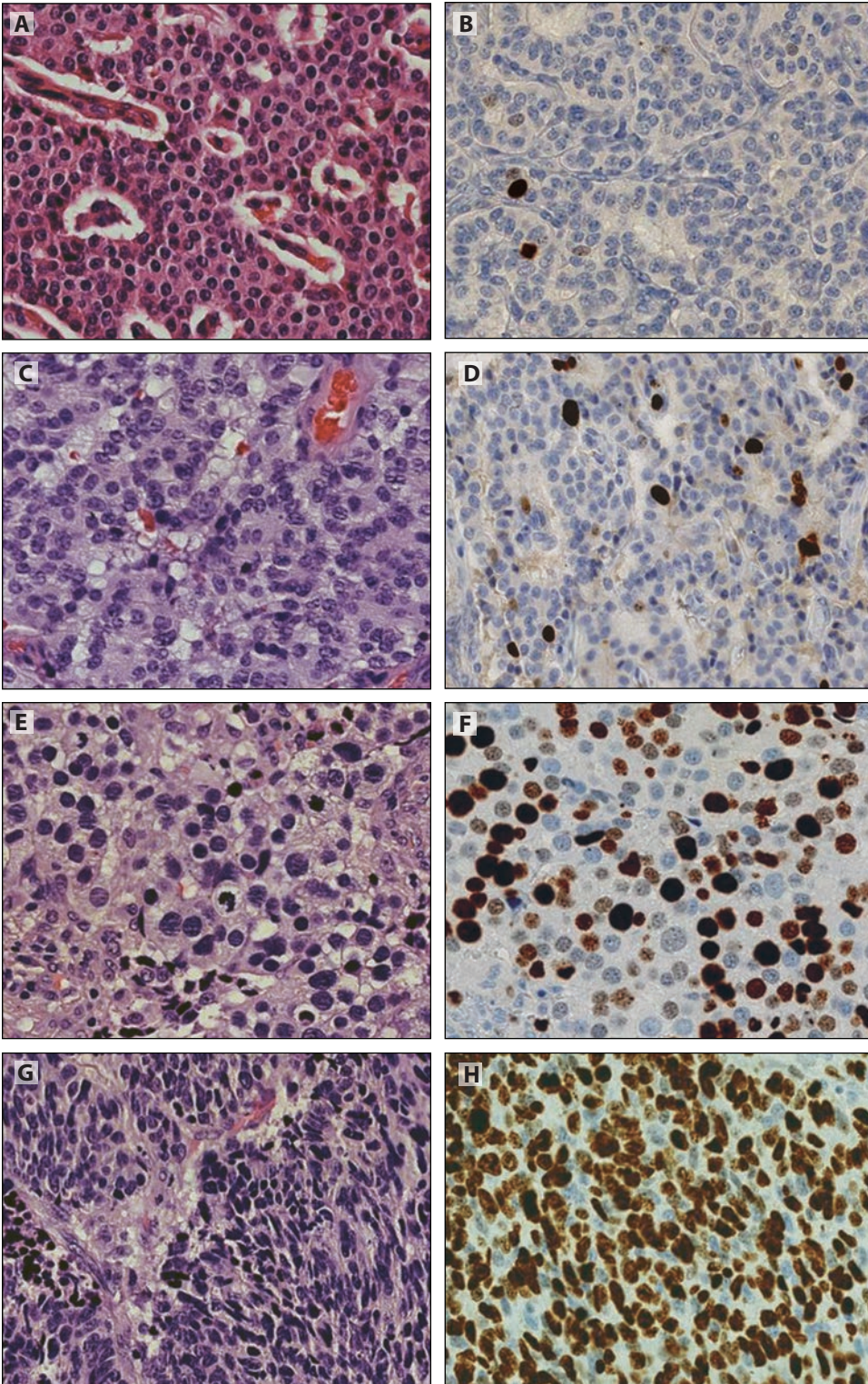


Figura 11-2. El espectro de tumores neuroendocrinos del pulmón incluye (**A y B**) tumores carcinoides típicos, (**C y D**) tumores carcinoides atípicos, (**E y F**) carcinoma neuroendocrino de células grandes y (**G y H**) carcinoma microcítico; (*columna izquierda*) H&E, $\times 400$ y (*columna derecha*) Ki-67 (clon MIB-1), $\times 400$.

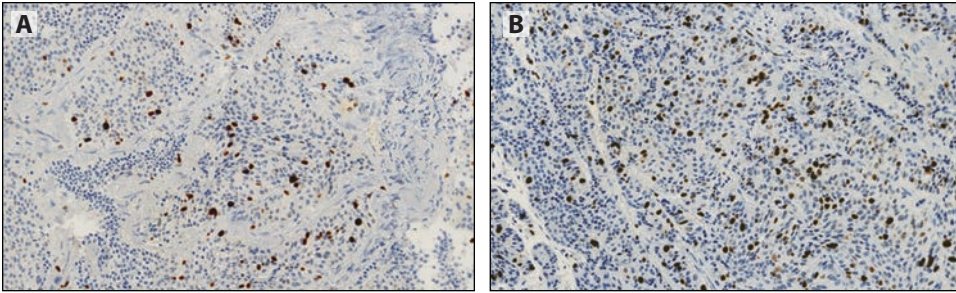


Figura 11-3. El índice de marcado de este tumor carcinoide fue del (A) 8,96 % en la biopsia bronquial inicial y del (B) 17,25 % en la muestra de resección quirúrgica. Ki-67 (clon MIB-1), $\times 400$.

métodos estandarizados para la puntuación (véase la sección “Cómo se evalúa la Ki-67”) (Fabbri et al., 2017; Boland et al., 2020), con la heterogeneidad de la Ki-67 y con la biología de estos tumores con mayores valores de Ki-67 y de tasas mitóticas observados a menudo en muestras metastásicas en comparación con los tumores primarios (Rekhtman et al., 2019b).

Resumen de respuesta

La concordancia del índice de proliferación de la Ki-67 entre las muestras de biopsia pequeñas y las muestras de resección no ha sido bien caracterizada.

¿Cuál es el papel pronóstico de la Ki-67 en los carcinomas de pulmón no microcíticos?

Varios estudios y metaanálisis sugieren que un nivel elevado de Ki-67 es un factor pronóstico negativo para los pacientes con carcinoma no microcítico (Wei et al., 2018; Yatabe et al., 2019; Chiriac, 2016). La falta de datos de buena calidad con base en una evaluación estandarizada de la Ki-67, junto con la carencia de una utilidad clínica clara, ha impedido su uso en la práctica clínica de rutina.

Resumen de respuesta

No hay una función clínica establecida para la evaluación de la Ki-67 como marcador pronóstico en los carcinomas no microcíticos.

¿Es importante el anticuerpo inmunohistoquímico de la Ki-67?

Existen varios anticuerpos de la Ki-67 disponibles comercialmente (Biocompare, s. f.), y el clon MIB-1 es el más usado, aunque no se dispone de datos de buena calidad que comparen diferentes clones de anticuerpo en tumores pulmonares (Pelosi et al., 2014). El uso de fijación con CytoLyt inhibe la inmunorreactividad para MIB-1, por lo que recientemente se ha recomendado el clon 30-9 de la Ki-67 para los bloques celulares fijados con CytoLyt (Buonocore et al., 2019). Por otra parte, la fijación en formalina neutra amortiguada puede evitar este inconveniente (Figura 11-4). Si la activación del antígeno (la recuperación de epítipo inducida por calor) se realiza de manera correcta, una subfijación (<6 horas) puede ser más contraproducente para la tinción de MIB-1 en comparación con la sobrefijación.

Resumen de respuesta

El clon MIB-1 es el anticuerpo más utilizado para evaluar la Ki-67, aunque hay pocos datos sobre la comparación de diferentes clones en los tumores pulmonares.

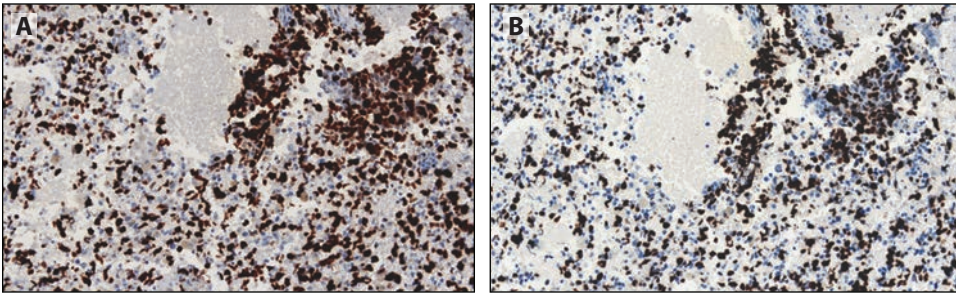


Figura 11-4. Este bloque celular de un carcinoma microcítico metastásico se fijó en formalina amortiguada. No se pueden observar diferencias significativas en la expresión de Ki-67 (A) al comparar el clon MIB-1 con (B) el clon 30-9. Ki-67 (clon MIB-1), $\times 400$.

¿Cómo se evalúa la Ki-67?

No se ha establecido un método de puntuación estándar para los tumores neuroendocrinos pulmonares (o para algún tumor torácico), y se carece de estudios de reproducibilidad que comparen diferentes énfasis. La mayoría de los estudios se han centrado en los tumores carcinoides (Rekhtman et al., 2019b; Marchevsky et al., 2018; Boland et al., 2020) y han usado el método de *hot spot* y el conteo manual de las células positivas (Marchevsky et al., 2018). En los tumores con expresión homogénea, se puede calcular un valor único para el índice de proliferación de Ki-67 con base en el porcentaje de células que muestran tinción nuclear para Ki-67 en (1) un campo $\times 20$ o un área de 2 mm^2 , o (2) 500 a 2000 células (Rekhtman et al., 2019b; Pelosi et al., 2019). En casos de heterogeneidad, se ha usado tanto el *hot spot* como los valores promedio de Ki-67 (Rekhtman et al., 2019b). La cuantificación automatizada con algoritmos nucleares validados puede contribuir a la estandarización (Boland et al., 2020), pero este método no está disponible ampliamente.

Resumen de respuesta

No hay un método estandarizado establecido para la evaluación de la Ki-67 en los tumores torácicos.

Conclusiones

Actualmente, el uso de rutina de los marcadores de proliferación inmunohistoquímica no tiene una función definida en la evaluación diagnóstica de los tumores neuroendocrinos pulmonares (u otros tumores torácicos). En el contexto de biopsias trituradas y pequeñas o de muestras de citología subóptimas de tumores neuroendocrinos, la Ki-67 puede ser útil para ayudar a diferenciar los tumores carcinoides de los carcinomas neuroendocrinos de alto grado, así como para evitar problemas de sobrediagnóstico de tumores neuroendocrinos de alto grado.

Referencias

Biocompare. Anti-Ki-67 antibody products. Accessed March 30, 2020. <https://www.biocompare.com/pfu/110447/soids/3219/Antibodies/Ki-67>

Boland JM, Kroneman TN, Jenkins SM, et al. Ki-67 labeling index in pulmonary carcinoid tumors: comparison between small biopsy and resection using tumor tracing and hot spot methods. *Arch Pathol Lab Med*. Published online January 16, 2020. doi:10.5858/arpa.2019-0374-OA

Buonocore DJ, Konno F, Jungbluth AA, et al. CytoLyt fixation significantly inhibits MIB1 immunoreactivity whereas alternative Ki-67 clone 30-9 is not susceptible to the inhibition: critical diagnostic implications. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(10):643-649.

Chirieac LR. Ki-67 expression in pulmonary tumors. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(5):547-551.

Dermawan JKT, Farver CF. The role of histologic grading and Ki-67 index in predicting outcomes in pulmonary carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(2):224-231.

Fabbri A, Cossa M, Sonzogni A, et al. Ki-67 labeling index of neuroendocrine tumors of the lung has a high level of correspondence between biopsy samples and surgical specimens when strict counting guidelines are applied. *Virchows Arch*. 2017;470(2):153-164.

Marchevsky AM, Hendifar A, Walts AE. The use of Ki-67 labeling index to grade pulmonary well-differentiated neuroendocrine neoplasms: current best evidence. *Mod Pathol*. 2018;31(10):1523-1531.

Naheed S, Holden C, Tanno L, et al. The utility of Ki-67 as a prognostic biomarker in pulmonary neuroendocrine tumours: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2019;9(8):e031531.

Pelosi G, Massa F, Gatti G, et al. Ki-67 evaluation for clinical decision in metastatic lung carcinoids: a proof of concept. *Clin Pathol*. 2019;12:2632010X19829259.

Pelosi G, Rindi G, Travis WD, et al. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol*. 2014;9(3):273-284.

Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(11):1628-1638.

Rekhtman N, Baine MK, Bishop JA. *Quick Reference Handbook for Surgical Pathologists*. 2.^a ed. Springer; 2019. (a)

Rekhtman N, Desmeules P, Litvak AM, et al. Stage IV lung carcinoids: spectrum and evolution of proliferation rate, focusing on variants with elevated proliferation indices. *Mod Pathol*. 2019;32(8):1106-1122. (b)

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. eds. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015.

Wei DM, Chen WJ, Meng RM, et al. Augmented expression of Ki-67 is correlated with clinicopathological characteristics and prognosis for lung cancer patients: an up-dated systematic review and meta-analysis with 108 studies and 14,732 patients. *Respir Res*. 2018;19(1):150.

Yatabe Y, Dacic S, Borcuk AC, et al. Best practice recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.

Inmunohistoquímica en citología

12

Por Lukas Bubendorf, Yuchen Han y Andre L. Moreira

Introducción

La capacidad de realizar una inmunotinción de alta precisión en muestras citológicas es crucial, puesto que hasta el 40 % de todos los diagnósticos de cáncer de pulmón se realiza únicamente mediante citología. La citología no solo es equivalente a la histología para la subtipificación del carcinoma no microcítico (CNM), sino que también es un método mínimamente invasivo y preferido para recolectar material tumoral para análisis repetitivo de biomarcadores en enfermedades recurrentes o metastásicas (Sigel et al., 2011). La aspiración transbronquial con aguja fina guiada por ultrasonido endobronquial (EBUS-FNA) está entre las técnicas citológicas más satisfactorias. Sin embargo, también son importantes otras modalidades como la FNA transtorácica, las secreciones o cepillados bronquiales, el lavado broncoalveolar y los derrames pleurales, así como la FNA de focos metastásicos distantes. La principal diferencia y el desafío en la citología se relaciona con la mayor variabilidad de las condiciones preanalíticas y con la falta de contextura tisular en comparación con la histología. Con el surgimiento de un número cada vez mayor de biomarcadores predictivos en el CNM, la inmunohistoquímica (IHQ) se ha usado como una alternativa rápida y rentable a la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y a las pruebas moleculares en el cribado de varias de estas alteraciones (Jain et al., 2019). La situación actual y los desafíos de las pruebas IHQ en la citología se han abordado recientemente en varias publicaciones (Zhou y Moreira, 2016; Bubendorf et al., 2017; Yatabe et al., 2019; Jain et al., 2019). Es incuestionable la necesidad de realizar pruebas inmunohistoquímicas en las muestras citológicas de cáncer de pulmón.

¿Qué parte de la muestra citológica es mejor para la inmunotinción: el bloque celular, los frotis secados al aire o fijados en etanol?

Muestras de bloque celular

En principio, las preparaciones citológicas se pueden agrupar en citología de *bloque celular* y citología *sin bloque celular*. Los bloques celulares son el formato de citología más accesible para la inmunotinción debido a que se pueden manipular de la misma forma que las muestras histológicas fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE), para las que se han optimizado los

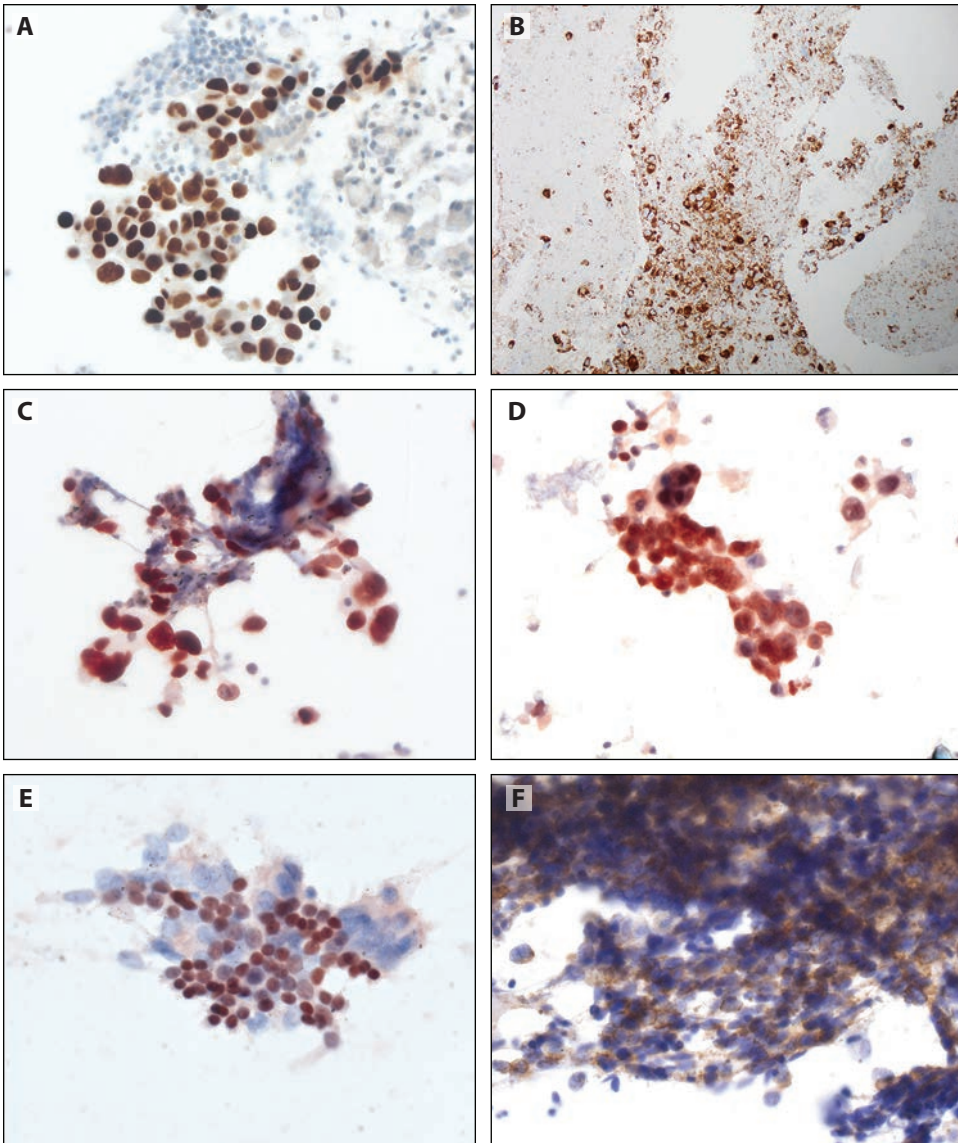


Figura 12-1. (A) Carcinoma no microcítico (CNM) positivo para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) en bloque celular de aspiración transbronquial con aguja fina (TBNA) guiada por ultrasonido endobronquial (EBUS) usando el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (BenchMark ULTRA, $\times 400$). (B) CNM positivo para napsina A en bloque celular de EBUS-TBNA usando el cromógeno DAB (BenchMark ULTRA, $\times 400$). (C-F) IHC en frotis previamente fijados en etanol y con tinción de Papanicolaou usando el cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Leica Bond). (C) CNM positivo para TTF1 en EBUS-TBNA ($\times 400$). (D) Carcinoma de células escamosas positivo para p40 en citología por cepillado ($\times 630$). (E) Células basales benignas positivas para p40 subyacentes a células respiratorias ciliadas ($\times 400$). (F) Expresión de CD56 en un carcinoma microcítico con acentuación membranosa (TBNA, $\times 400$).

protocolos de inmunotinción ([figura 12-1A y B](#)). Esto está respaldado por estudios que muestran resultados sumamente acordes para diferentes marcadores entre los bloques celulares y las muestras histológicas con características semejantes (Yatabe et al., 2019). Sin embargo, la falta de estándares internacionales en relación con los métodos previos a la fijación y el protocolo de preparación sigue siendo uno de los principales problemas en el uso de los bloques celulares (Jain et al., 2014; Saqi, 2016). Actualmente, se usan más de 10 métodos para preparaciones de bloques celulares, siendo los más comunes en Estados Unidos la trombina plasmática, HistoGel

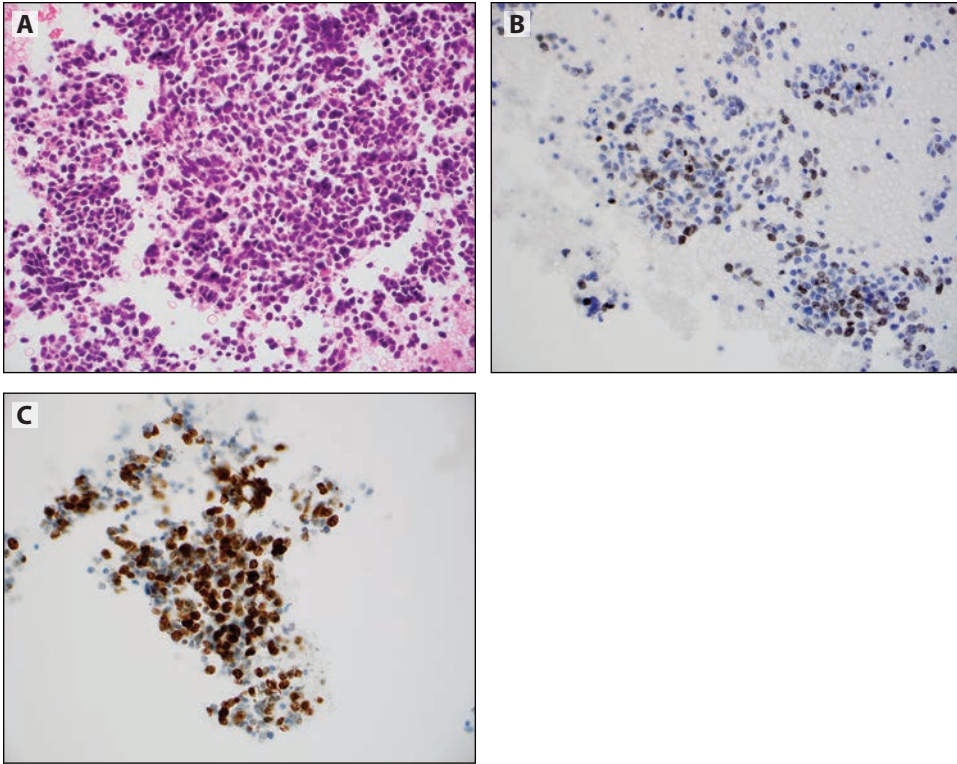


Figura 12-2. (A) Corte teñido con H&E de un bloque celular para un tumor neuroendocrino, con tinción positiva para cromogranina y sinaptofisina. La muestra se fijó con etanol (B) y formalina (C), y se realizó inmunotinción. (B) Tinción IHQ para Ki-67 (clon MIB-1) que muestra positividad baja para el marcador, lo que indica un tumor carcinoide de bajo grado. (C) La tinción IHQ para Ki-67 (clon 30.9) es positiva en más del 50 % de las células tumorales, lo que indica un tumor neuroendocrino (NE) de alto grado. (Imágenes proporcionadas por el Dr. N. Rekhtman, Memorial Sloan Kettering Cancer Center)

(*Thermo Fisher Scientific*), sistema automatizado de bloque celular Cellient (*Hologic*) (Crapanzano et al., 2014) y modificaciones de estos (Rekhtman et al., 2018). Casi todos los protocolos comparten el paso final del fijado del pellet en formalina amortiguada al 10 % y su procesamiento en un bloque FFPE. El gran espectro de fijación varía desde la fijación del material celular en formalina amortiguada al 10 %, la prefijación en solución a base de etanol o metanol antes de la fijación en formalina, e incluso la fijación pura en etanol al 95 %.

Aunque la gran variedad de medios de transporte, los prefijadores y los protocolos para el uso de bloques celulares no parecen ocasionar problemas sistemáticos en la inmunotinción de acuerdo con un estudio previo (Fischer et al., 2014), análisis recientes indican que existen desafíos específicos relacionados con factores preanalíticos en los bloques celulares, en especial con la prefijación con etanol o metanol (Zhou y Moreira, 2016). Además de la expresión ausente o casi ausente del factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) con fijador CytoLyt (Gruchy et al., 2015), casi la mitad (43 %) de los 30 anticuerpos evaluados en el sistema de bloques celulares Cellient (*Hologic*) fallaron en la validación inicial usando las condiciones establecidas para las muestras tisulares FFPE en el instrumento de tinción BenchMark XT Automated IHC/ISH (Sauter et al., 2016). Además, conocer el impacto del clon de anticuerpo y de las condiciones previas a la fijación puede prevenir problemas significativos cuando se evalúa la IHQ diagnóstica. La [figura 12-2](#) resalta el efecto de la fijación a base de alcohol en un clon de uso común de Ki-67 (Buonocore et al., 2019).

Aunque los bloques celulares FFPE se han convertido en el tipo de preparación citológica preferido para el análisis IHQ, tienen ciertas limitaciones. Los bloques celulares consumen más

tiempo, son más costosos y suponen un mayor desafío técnico que las preparaciones que no utilizan bloques celulares; además, no están disponibles de manera uniforme en todos los pacientes ni en todos los laboratorios (Nambirajan y Jain, 2018; Hendry et al., 2020).

Muestras obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares

Las muestras de citología obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares consisten en diversas preparaciones, las cuales incluyen frotis secados al aire y fijados en alcohol, muestras obtenidas por cytospin (Cytospin, *Thermo Fisher Scientific*), preparaciones en base líquida como ThinPrep (*Hologic*), o SurePath (*Becton Dickinson*). La gran variedad de condiciones preanalíticas y métodos de preparación hace incluso más difícil la estandarización de la inmunotinción en muestras obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares. Los fijadores de uso más amplio en la citología que no utiliza bloques celulares incluyen al fijador Saccomanno a base de etanol (50 % de etanol y 2 % de polietilenglicol), Delaunay (partes iguales de etanol y acetona mezcladas con 0,5 mL de ácido tricloroacético 1 M) y los fijadores comerciales en aerosol, mientras que el CytoLyt a base de metanol o las soluciones PreservCyt (esta última optimizada para el sistema de preparación de portaobjetos de citología de base líquida ThinPrep) (*Hologic*) sirven como preservantes y medios de transporte. El líquido de operación hemolítico CytoRich Red, a base de etanol (*Thermo Fisher Scientific*), también contiene formalina. Todos estos fijadores y medios de transporte pueden ser problemáticos para la inmunotinción, y se han obtenido frecuentes resultados disonantes con la histología para algunos anticuerpos (Gong et al., 2003; Skoog y Tani, 2011; Sauter et al., 2016; Gorman et al., 2012; Buonocore et al., 2019).

No obstante, en el U.K. *National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS), casi todos los fijadores distintos de la formalina para inmunohistoquímica, incluyendo al Delaunay, las soluciones a base de metanol y de etanol, además del CytoRich Red a base de etanol y formalina, produjeron una calidad de inmunotinción similar a la de la formalina por sí sola (Kirbis et al., 2011). De este modo, un laboratorio puede usar cualquiera de estos fijadores según sus necesidades, con la única advertencia de revalidar rigurosamente sus procedimientos de inmunohistoquímica antes de la aplicación clínica. De hecho, los datos indican que, con las modificaciones apropiadas en los factores analíticos, la IHQ en preparaciones obtenidas por métodos distintos al de bloques celulares puede ser equivalente a la IHQ en el tejido FFPE o en los cortes de bloque celular (Abendroth y Dabbs, 1995; Leung y Bedard, 1996; Denda et al., 2012; Kalhor et al., 2006; Savic et al., 2013; Russell-Goldman et al., 2018; Lozano et al., 2019). Muchos laboratorios que aplican inmunotinción a muestras obtenidas mediante métodos distintos al de los bloques celulares utilizan portaobjetos diagnósticos y tinción de Papanicolaou (Fischer et al., 2014; Schmitt et al., 2011) ([figura 12-1C-F](#)).

La tinción de Papanicolaou previa, que no interfiere de manera negativa con la reacción de la inmunotinción, permite el triage de los portaobjetos disponibles para inmunotinción y el marcado de las áreas de interés especial. Se han obtenido resultados variables con los frotis directos secados al aire y con las muestras obtenidas con cytospin; y algunos autores reportan una falta completa de tinción (Fischer et al., 2014; Liu y Farhood, 2004), mientras que otros reportan una IHQ exitosa en portaobjetos no teñidos y fijados después en formalina (Fulciniti et al., 2008; Roh et al., 2012) y/o alcohol/metanol/acetona (Skoog y Tani, 2011). Las contratinciones de la tinción de Papanicolaou usualmente se blanquean durante el bloqueo con peroxidasa endógena y/o durante la recuperación del antígeno (Denda et al., 2013). Antes de la IHQ, los portaobjetos preteñidos de citología sin bloque celular debían ser humedecidos en xileno para disolver los medios de montaje permanentes y remover el cubreobjetos. Este proceso tarda algunas horas para muestras frescas, pero puede requerir hasta varios días en estudios retrospectivos, dependiendo de la duración del período de archivado. Los epítomos en los portaobjetos de citología, fijados en alcohol y teñidos previamente, permanecen intactos durante un periodo de archivado de al menos 1 a 2 años, si están sellados adecuadamente

con un cubreobjetos (Vlajnic et al., 2018). Se encontró que la recuperación de antígeno inducida por calor (HIAR) es esencial para el descubrimiento de la reactividad de los epítomos para todos los antígenos nucleares y para un subgrupo de antígenos citoplasmáticos y membranosos en frotis fijados con alcohol y con tinción de Papanicolaou (Denda et al., 2012). También se ha encontrado que la HIAR mejora la tinción IHQ para ciertos antígenos en muestras de ThinPrep (Zhang et al., 2012) y para frotis secados al aire y fijados posteriormente en formalina (Roh et al., 2012). Una duración menor de la HIAR es suficiente para los frotis de citología en comparación con el tejido FFPE. La HIAR se debe optimizar por separado para cada anticuerpo.

El uso de plataformas de tinción automatizadas mejorará la estandarización y reproducibilidad de los resultados de la IHQ, pero aún son escasos los datos publicados sobre las preparaciones obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares. Algunos laboratorios trabajan con el sistema de tinción automatizado Leica Bond (Vlajnic et al., 2018), las plataformas BenchMark XT/ULTRA (Jain et al., 2018; Martínez et al., 2013; Lozano et al., 2019), o los sistemas de tinción automatizados Dako (Noll et al., 2018). La evaluación externa de calidad también es importante para mantener una calidad de inmunotinción elevada. De hecho, UK NEQAS tiene un programa externo de evaluación de calidad para ayudar en la estandarización y mejorar la calidad de la inmunotinción en la citología (Kirbis et al., 2011).

Resumen de respuesta

Todas las preparaciones citológicas, incluidos los bloques celulares y los portaobjetos fijados en etanos y secados al aire, se pueden utilizar principalmente para inmunotinción. Los bloques celulares fijados con formalina son los más sencillos y los más utilizados. Se requiere una rigurosa optimización del protocolo, validación y control de calidad en la inmunotinción de muestras citológicas, especialmente en las preparaciones que no utilizan bloques celulares.

¿Qué grado de fiabilidad tienen las pruebas de biomarcadores inmunohistoquímicos predictivos en las muestras citológicas de cáncer de pulmón?

El interés por la IHQ de la citología ha ganado mucho terreno en la era de las pruebas de biomarcadores predictivos, bien sea como un biomarcador selectivo para tratamiento (por ejemplo, ligando 1 de muerte programada [PD-L1] y quinasa del linfoma anaplásico [ALK]) o como un método precribado para pruebas moleculares subsecuentes (por ejemplo, *oncogén 1 c-ros* [ROS1] y *quinasa del receptor de tirosina neurotrópico* [NTRK]). Claramente, el PD-L1 ha sido el principal factor detrás de este desarrollo, según lo evidenciado por el número cada vez mayor de publicaciones sobre pruebas para PD-L1 en citología durante los últimos años (Gosney et al., 2020). Las pruebas IHQ predictivas validadas se ajustaron a las muestras histológicas, y las muestras citológicas no habían sido analizadas en ensayos clínicos relacionados con agentes dirigidos o inhibidores de puntos de control inmunitario en ese momento (Thunnissen et al., 2018). A pesar de ello, con los avances en los procedimientos diagnósticos mínimamente invasivos que producen muestras predominantemente citológicas, hay una creciente demanda de pruebas de biomarcadores predictivos en muestras de citología en la práctica clínica (Jain et al., 2019). Se requiere la revalidación de la prueba cuando se realiza una prueba IHQ validada en muestras de citología debido a las diferencias en sus técnicas de procesamiento (Fitzgibbons et al., 2014). Como se discutió con anterioridad, la mayor variabilidad en los factores preanalíticos de las muestras de citología hace difícil la estandarización de la inmunohistoquímica en la citología.

IHQ para PD-L1

La prueba del PD-L1 en bloques celulares se ha convertido en una práctica diagnóstica común al utilizar las pruebas y los protocolos que se desarrollaron para muestras histológicas.

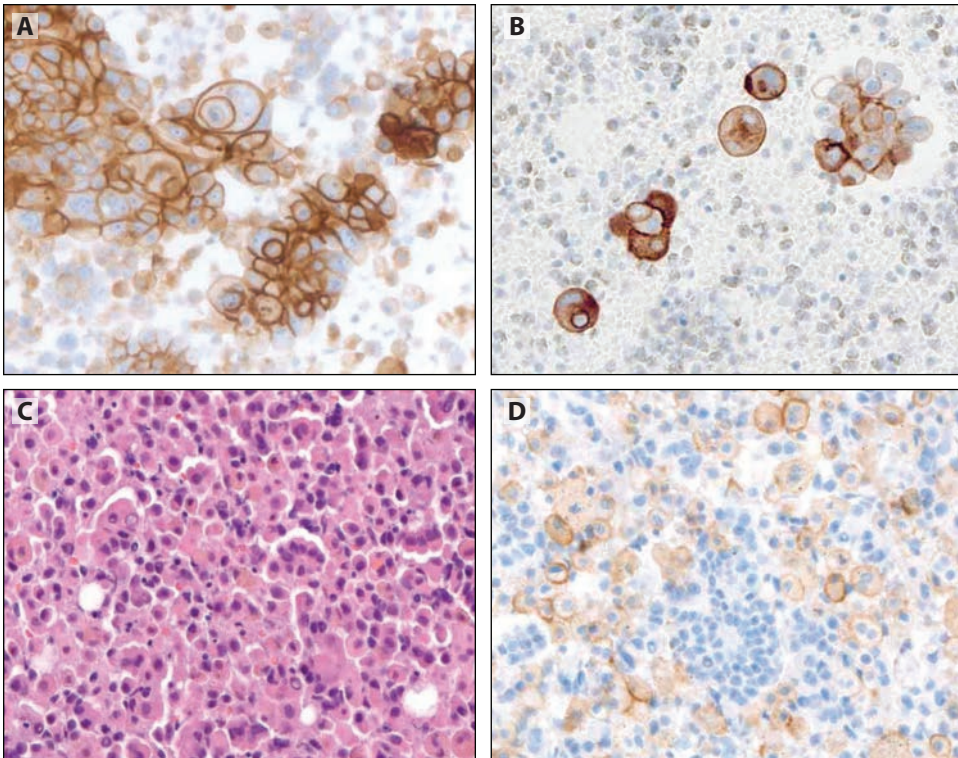


Figura 12-3. IHQ para ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en muestras de carcinoma no microcítico (CNM) en bloque celular utilizando la prueba *VENTANA PD-L1 (SP263)* en BenchMark ULTRA. Tinción membranosa pronunciada en (A) todas las células tumorales o (B) en la mayoría de las células tumorales (derrames malignos; $\times 400$, cada uno). (C-D) Agregados negativos para PD-L1 de células de adenocarcinoma e histiocitos mezclados y focalmente pigmentados, la mayoría débilmente positivos para PD-L1 (H&E y PD-L1, FNA: $\times 400$, cada uno).

De hecho, esta práctica ha sido justificada por la evidencia *post hoc* acumulada, que indica una tasa de éxito elevada de la IHQ para PD-L1 y una concordancia elevada entre los bloques celulares y la histología equivalente, según lo indicado en una revisión reciente de 9 estudios elegibles (Gosney et al., 2020). Por el contrario, apenas están surgiendo datos sobre muestras obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares, pero apuntan en la misma dirección (Noll et al., 2018; Jain et al., 2018; Capizzi et al., 2018; Lozano et al., 2019; Munari et al., 2019).

En las muestras histológicas, la positividad para la tinción de PD-L1 se define como una tinción de membrana citoplasmática completamente circunferencial o lineal parcial de cualquier intensidad en las células tumorales. La tinción citoplasmática en las células tumorales no se considera positiva únicamente para propósitos de la puntuación. Esto también es cierto para los cortes de bloque celular ([figura 12-3A](#) y [B](#)). Sin embargo, en las muestras citológicas obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares, la tinción membranosa es menos definida debido a que las membranas celulares están intactas y no cortadas, como en los cortes tisulares FFPE (Bubendorf et al., 2017). De este modo, la tinción para PD-L1 de la membrana celular orientada horizontalmente puede aparecer como una tinción de superficie difusa que imita a la tinción citoplasmática ([figura 12-4](#)). La sobreestimación de la positividad para PD-L1 ocasionada por la tinción citoplasmática inespecífica de los macrófagos y células inflamatorias del fondo se puede producir tanto en las muestras de bloque celular como en las muestras obtenidas por métodos distintos al del bloque celular, y puede ser particularmente desafiante en las muestras de derrame con predominio de células tumorales aisladas y mezcladas con células inflamatorias y mesoteliales ([figuras 12-3C, D](#) y [12-4D](#)). Una inmunotinción confirmatoria, como la de TTF1 y/o un marcador panleucocitario (por ejemplo, CD45), realizada en un corte correspondiente, puede ayudar a la confirmación de células tumorales para la puntuación

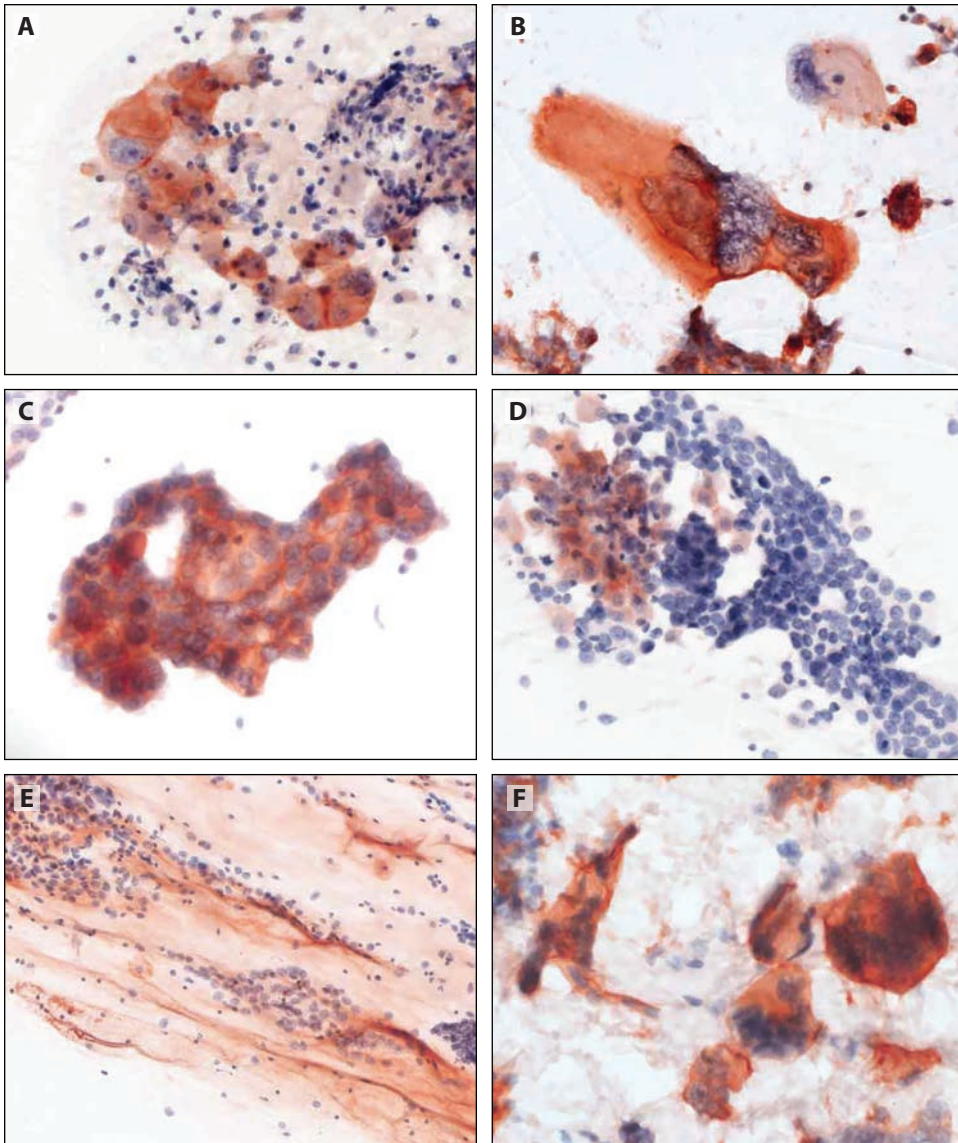


Figura 12-4. IHQ para ligando 1 de muerte programada (PD-L1) de muestras de citología de CNM fijadas con etanol y con tinción de Papanicolaou, usando pruebas desarrolladas en laboratorio (LDT) para PD-L1 en Leica Bond. **(A)** Células tumorales positivas para PD-L1 con acentuación membranosa focal (prueba VENTANA PD-L1 [SP263], $\times 400$). **(B)** Célula tumoral pleomórfica con tinción difusa tipo citoplasmática (prueba VENTANA PD-L1 [SP142], $\times 630$). **(C)** Células tumorales con tinción tipo citoplasmática y acentuación membranosa focal (Leica 73-10, $\times 400$). **(D)** Células tumorales negativas para PD-L1 con macrófagos que sirven como control de tinción positivo (prueba VENTANA PD-L1 [SP263], $\times 400$). **(E)** Tinción débil y no específica de la mucina y células tumorales negativas para PD-L1 (prueba VENTANA PD-L1 [SP263], $\times 200$). **(F)** Células trofoblásticas placentarias disociadas que sirven como controles positivos para PD-L1 (prueba VENTANA PD-L1 [SP263], $\times 400$).

de positividad para PD-L1. Considerando estas dificultades inherentes en la interpretación de la IHQ para PD-L1 y la heterogeneidad conocida de la expresión de PD-L1, se debe evitar la evaluación en muestras citológicas con menos de 100 células tumorales (Hendry et al., 2020), mientras que otros sugieren incluso al menos 400 células tumorales (Dong et al., 2020). En contraste con la puntuación de las células tumorales, una puntuación confiable de inmunocitos (IC) de muestras citológicas es casi imposible debido a la carencia de contexto arquitectural del tejido y, en consecuencia, no se debe practicar.

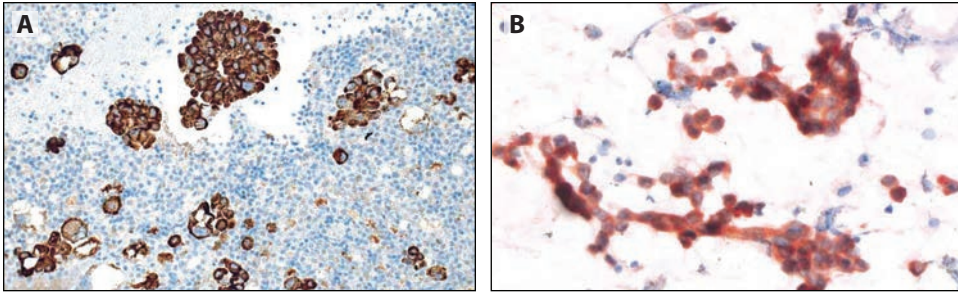


Figura 12-5. Dos IHQ de adenocarcinomas de pulmón con reordenamiento de quinasa de linfoma anaplásico (ALK). Pruebas desarrolladas en laboratorio (LDT) con anticuerpo 5A4 (Novocastra) en (A) bloque celular de derrame maligno de adenocarcinoma de pulmón (BenchMark ULTRA, 3,3'-diaminobencidina [DAB], $\times 200$) y (B) muestra transbronquial de aspiración con aguja fina (TBNA) previamente fijada en etanol y con tinción de Papanicolaou (Leica Bond, 3-amino-9-ethylcarbazol [AEC], $\times 400$).

IHQ para ALK, ROS1 y pan-TRK

La IHQ para detectar la sobreexpresión de la ALK o de la proteína ROS1 es un método bien establecido de cribado del CNM para FISH posterior o para una evaluación adicional de hallazgos inciertos en la FISH (como se describe en detalle en el capítulo 19). Al igual que con las muestras histológicas, la IHQ para ALK se aplica bastante a las muestras citológicas ([figura 12-5](#)). La mayoría de los estudios sobre la IHQ de la ALK en citología se han realizado en bloques celulares FFPE sin modificación del procedimiento de IHQ al usar clones 5A4 o D5F3 en varias plataformas de tinción automatizadas (Jain et al., 2019). Estos estudios han demostrado de manera uniforme sensibilidades del 100 %, aunque con especificidades variables (83 %-100 %) para la presencia de reordenamiento de ALK por FISH. Las preparaciones fijadas en etanol obtenidas por métodos distintos al de los bloques celulares también han sido evaluadas mediante IHQ para ALK. Excepto por dos estudios que reportan una sensibilidad del 100 % en frotis fijados con alcohol, otros estudios reportan pocas sensibilidades relativas mediante IHQ, las cuales varían del 66 % al 86 % (Jain et al., 2019). Ninguno de los últimos estudios utilizó la prueba altamente sensible *VENTANA ALK (D5F3) CDx* que se ha usado en la mayoría de los estudios de bloque celular.

La IHQ para ROS1 es sumamente precisa para el precribado de los cánceres de pulmón con reordenamiento *ROS1* en muestras histológicas y bloques celulares, según lo señalado en el capítulo 19. Este también parece ser el caso para los frotis de citología y las muestras obtenidas con cytospin cuando se usa el anticuerpo monoclonal de conejo D4D6 (*Cell Signaling Technology, Inc.*) en el sistema de tinción inmunológico automatizado Leica Bond (Vlajnic et al., 2018) ([figura 12-6](#)). Los datos obtenidos en una nueva prueba *VENTANA ROS1 (SP384)* de anticuerpo monoclonal primario de conejo en muestras citológicas todavía no están disponibles. La IHQ para ROS1 es sumamente sensible, pero carece de especificidad (Hung y Sholl, 2018). El anticuerpo tiñe los macrófagos y los neumocitos reactivos, y muestra además cierta reactividad en adenocarcinomas con reordenamiento distinto al *ROS1*; por lo tanto, se recomienda la confirmación de los resultados mediante FISH o secuenciación de nueva generación.

La evaluación de los reordenamientos *NTRK1-3*, un biomarcador agnóstico de tumor para seleccionar pacientes para tratamiento con inhibidores de NTRK, se ha convertido en otra necesidad en los CNM y en otros tumores sólidos. Debido a la muy baja prevalencia de los reordenamientos de *NTRK* en el CNM (<0,5 %), se ha recomendado el precribado mediante IHQ. Se ha mostrado que la IHQ pan-TRK con el anticuerpo anti-pan-TRK EPR173 es sensible y específica en muestras histológicas. Está disponible una prueba comercial *Ventana in vitro diagnostics (IVD)* para tejido neoplásico FFPE (Hechtman et al., 2017). Es previsible que la pan-TRK también funcionará en muestras de citología, pero todavía no se dispone de esos datos ([figura 12-7](#)).

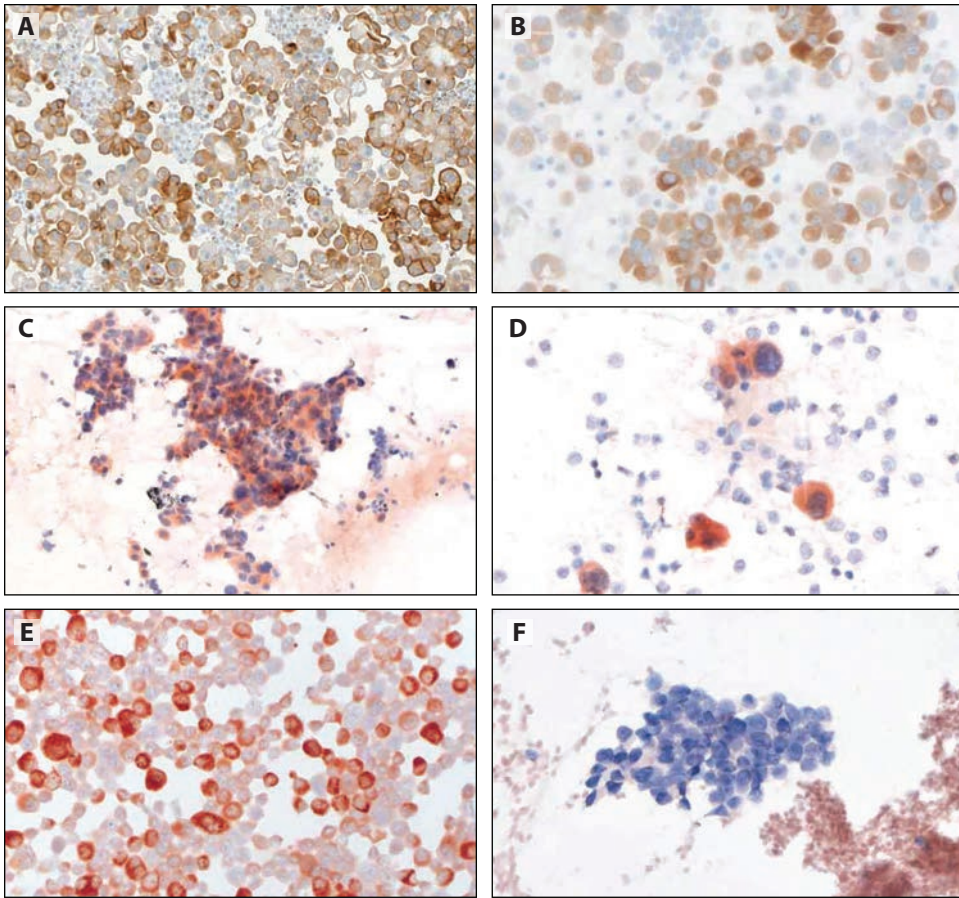


Figura 12-6. IHQ para ROS1. (A-B) Bloques celulares en el BenchMark ULTRA con el kit de detección IHQ Optiview DAB y (C-F) muestras previamente fijadas con etanol y con tinción de Papanicolaou con el anticuerpo D4D6 (*Cell Signaling Technology, Inc.*) en el Leica Bond (AEC como cromógeno). (A) Derrame maligno en adenocarcinomas de pulmón con reordenamiento del oncogén 1 c-ros (*ROS1*) usando anticuerpo D4D6 (*Cell Signaling Technology, Inc.*, $\times 200$). (B) Tinción no específica para *ROS1* de un adenocarcinoma de pulmón no reordenado, con mutación para el homólogo oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (*KRAS*) utilizando la prueba *VENTANA ROS1* (SP384) de anticuerpo monoclonal primario de conejo ($\times 400$). (C-D) Adenocarcinomas de pulmón con reordenamiento *ROS1* que muestran tinción citoplasmática homogénea ($\times 400$, cada uno). (E) Carcinoma no microcítico con reordenamiento *ROS1* (CPNM); la línea celular HCC78 sirve como control de tinción positivo ($\times 200$). (F) CNM negativo para *ROS1* con fondo hemorrágico ($\times 400$).

Resumen de respuesta

Las muestras citológicas se pueden utilizar para la IHQ predictiva de PD-L1, ALK y ROS1, y actualmente los bloques celulares son las preparaciones recomendadas. Los datos limitados sobre estas IHQ predictivas en portaobjetos sin bloques celulares son prometedores, pero necesitan más confirmación.

Conclusiones

No hay duda de que las muestras citológicas sirven como recursos útiles e indispensables para las pruebas complementarias en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de pulmón, incluyendo la IHQ. Los

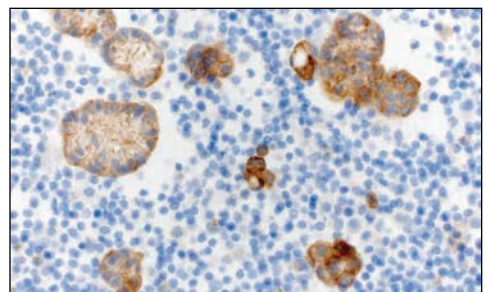


Figura 12-7. Células de adenocarcinoma de pulmón con fusión genética *CLIP1-NTRK1* confirmada. Inmunohistoquímica positiva con el anticuerpo Abcam pan-TRK EPR17341 (bloque celular, $\times 400$). (Imagen cortesía de Joachim Diebold, Lucerna).

bloques celulares FFPE son el formato preferido y de uso más común, el cual se puede integrar en el flujo de trabajo técnico existente al usar protocolos IHQ basados en tejidos. Aunque las pruebas IHQ también funcionan en muestras de citología obtenidas con métodos distintos al de los bloques celulares en laboratorios experimentados, se requieren más estudios.

Referencias

- Abendroth CS, Dabbs DJ. Immunocytochemical staining of unstained versus previously stained cytologic preparations. *Acta Cytol.* 1995;39(3):379-386.
- Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens. In En: Dorfmueller P, Cavazza A, eds. *Pathology for the Clinician*, vol. 2. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144):170007.
- Buonocore DJ, Konno F, Jungbluth AA, et al. CytoLyt fixation significantly inhibits MIB1 immunoreactivity whereas alternative Ki-67 clone 30-9 is not susceptible to the inhibition: critical diagnostic implications. *Cancer Cytopathol.* 2019;127(10):643-649.
- Capizzi E, Ricci C, Giunchi F, et al. Validation of the immunohistochemical expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) on cytological smears in advanced non small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2018;126:9-14.
- Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, et al. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal.* 2014;11:7.
- Denda T, Kamoshida S, Kawamura J, et al. Optimal antigen retrieval for ethanol-fixed cytologic smears. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(3):167-176.
- Denda T, Kamoshida S, Kwamura J, et al. Rapid immunocytochemistry with simple heat-induced antigen retrieval technique for improvement in the quality of cytological diagnosis. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(12):920-930.
- Dong Z, Liu Y, Jiang T, et al. Cell block as a surrogate for programmed death-ligand 1 staining testing in patients of non-small cell lung cancer. *J Cancer.* 2020;11(3):551-558.
- Fischer AH, Schwartz MR, Moriarty AT, et al. Immunohistochemistry practices of cytopathology laboratories: a survey of participants in the College of American Pathologists Nongynecologic Cytopathology Education Program. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(9):1167-1172.
- Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11): 1432-1443.
- Fulciniti F, Frangella C, Staiano M, et al. Air-dried smears for optimal diagnostic immunocytochemistry. *Acta Cytol.* 2008;52(2):178-186.
- Gong Y, Sun X, Michael CW, et al. Immunocytochemistry of serous effusion specimens: a comparison of ThinPrep vs cell block. *Diagn Cytopathol.* 2003;28(1):1-5.
- Gorman BK, Kosarac O, Chakraborty S, et al. Comparison of breast carcinoma prognostic/predictive biomarkers on cell blocks obtained by various methods: cellient, formalin and thrombin. *Acta Cytol.* 2012;56(3):289-296.
- Gosney JR, Boothman AM, Ratcliffe M, et al. Cytology for PD-L1 testing: a systematic review. *Lung Cancer.* 2020;141:101-106.
- Gruchy JR, Barnes PJ, Dakin Hache KA. CytoLyt fixation and decalcification pretreatments alter antigenicity in normal tissues compares with standard formalin fixation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015;23(4):297-302.
- Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan-TRK immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(11):1547-1551.
- Hendry S, Byrne DJ, Christie M, et al. Adequate tumour cellularity is essential for accurate PD-L1 immunohistochemistry assessment on cytology cell-block specimens. *Cytopathology.* 2020;31(2):90-95.
- Hung YP, Sholl LM. Diagnostic and predictive immunohistochemistry for non-small cell lung carcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2018;25(6):374-386.
- Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology.* 2014;25(6):356-371.
- Jain D, Nambirajan A, Borczuk A, et al. Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol.* 2019;127(5):325-339.
- Jain D, Sukumar S, Mohan A, et al. Programmed death-ligand 1 immunoreexpression in matched biopsy and liquid-based cytology samples of advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Cytopathology.* 2018;29(6):550-557.
- Kalhor N, Zander DS, Liu J. TTF-1 and p63 distinguishing pulmonary small-cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma in

- previously pan-stained cytologic material. *Mod Pathol*. 2006;19(8):1117-1123.
- Kirbis IS, Maxwell P, Flezar MS, et al. External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology*. 2011;22(4):230-237.
- Leung SW, Bedard YC. Immunocytochemical staining on ThinPrep processed smears. *Mod Pathol*. 1996;9(3):304-306.
- Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell block preparations. *Cancer*. 2004;102(2):109-114.
- Lozano MD, Abengozar-Muela M, Echeveste JI, et al. Programmed death-ligand 1 expression on direct Pap-stained cytology smears from non-small cell lung cancer: comparison with cell blocks and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(7):470-480.
- Martinez P, Hernandez-Losa J, Montero MA, et al. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry as diagnostic methods for ALK positive non-small cell lung cancer patients. *PLoS One*. 2013;8(1):e52261.
- Munari E, Zamboni G, Sighele G, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 in non-small cell lung cancer: comparison between cytologic smears, core biopsies, and whole sections using the SP263 assay. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(1):52-61.
- Nambirajan A, Jain D. Cell blocks in cytopathology: an update. *Cytopathology*. 2018;29(6):505-524.
- Noll B, Wang WL, Gong Y, et al. Programmed death ligand 1 testing in non-small cell lung carcinoma cytology cell block and aspirate smear preparations. *Cancer Cytopathol*. 2018;126(5):342-352.
- Rekhtman N, Buonocore DJ, Rudomina D, et al. Novel modifications of HistoGel-based cell block preparation method: improved sufficiency for molecular studies. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(4):529-535.
- Roh MH, Schmidt L, Placido J, et al. The application and diagnostic utility of immunocytochemistry on direct smears in the diagnosis of pulmonary adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(11):949-955.
- Russell-Goldman E, Kravets S, Dahlberg SE, et al. Cytologic-histologic correlation of programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung carcinomas. *Cancer Cytopathol*. 2018;126(4):253-263.
- Saqi A. The state of cell blocks and ancillary testing: past, present, and future. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(12):1318-1322.
- Sauter JL, Grogg KL, Vrana JA, et al. Young investigator challenge: validation and optimization of immunohistochemistry protocols for use on cellient cell block specimens. *Cancer Cytopathol*. 2016;124(2):89-100.
- Savic S, Bode B, Diebold J, et al. Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol*. 2013;8(8):1004-1011.
- Schmitt F, Cochand-Priollet B, Toetsch M, et al. Immunocytochemistry in Europe: results of the European Federation of Cytology Societies (EFCS) inquiry. *Cytopathology*. 2011;22(4):238-242.
- Sigel CS, Moreira AL, Travis WD, et al. Subtyping of non-small cell lung carcinoma: a comparison of small biopsy and cytology specimens. *J Thorac Oncol*. 2011;6(11):1849-1856.
- Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*. 2011;22(4):215-229.
- Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al. Immunohistochemistry of pulmonary biomarkers: a perspective from the members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):408-419.
- Vlajnic T, Savic S, Barascud A, et al. Detection of ROS1-positive non-small cell cancer on cytological specimens using immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol*. 2018;126(6):421-429.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practice recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.
- Zhang Z, Zhao L, Guo H, et al. Diagnostic significance of immunocytochemistry on fine needle aspiration biopsies processed by thin-layer cytology. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(12):1071-1076.
- Zhou F, Moreira AL. Lung carcinoma predictive biomarker testing by immunoperoxidase stains in cytology and small biopsy specimens: advantages and limitations. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(12):1331-1337.

Marcadores inmunitarios para las variantes del adenocarcinoma de pulmón

13

Por Mari Mino-Kenudson y Sanja Dacic

Introducción

Las variantes del adenocarcinoma de pulmón comprenden el adenocarcinoma mucinoso invasivo (AMI), adenocarcinoma coloide, adenocarcinoma entérico y adenocarcinoma fetal. Estos adenocarcinomas exhiben características citomorfológicas típicas, y usualmente no se requiere de inmunohistoquímica (IHQ) para su diagnóstico. Sin embargo, las metástasis que se originan en sitios distintos del pulmón pueden compartir las mismas características histológicas. Por ende, la IHQ puede ser útil para diferenciar entre tumores primarios y metastásicos, y muchas veces es necesaria la correlación clinicopatológica para establecer un diagnóstico correcto. Además, la IHQ puede ser útil para excluir imitadores no malignos, a fin de confirmar el diagnóstico de AMI.

Adenocarcinoma mucinoso invasivo

Por lo general, el diagnóstico del AMI está basado en la citomorfología característica: células columnares altas con mucina intracitoplasmática abundante y/o células caliciformes que comprenden una fracción significativa de las células tumorales que muestran un patrón de crecimiento lepidico. Por lo tanto, usualmente no se requiere IHQ para llegar a un diagnóstico, pero hay algunas circunstancias en las que la IHQ puede ser útil para confirmarlo. Estas son: (1) confirmación del diagnóstico con base en una muestra tisular pequeña y (2) la diferenciación de procesos no malignos, entre ellos la metaplasia peribronquiolar con metaplasia mucinosa y el tumor papilar muconodular ciliado (adenoma bronquiolar). Además, el adenocarcinoma convencional en muy pocas oportunidades produce mucina exuberante y se puede confundir con un AMI. La diferenciación entre el AMI y un tumor productor de mucina de un sitio diferente del pulmón puede ser sumamente difícil dado que el perfil inmunológico del AMI es similar al de los adenocarcinomas primarios pancreatobiliares y del tracto gastrointestinal (GI).

¿Cuál es el perfil inmunológico del adenocarcinoma mucinoso invasivo?

La mayoría de los AMI son negativos o solo focalmente inmunorreactivos al factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y a la napsina A, mientras que casi todas las lesiones expresan citoqueratina 7 (CK7) ([figura 13-1](#)). Concurrentemente, la CK20 y un factor de transcripción

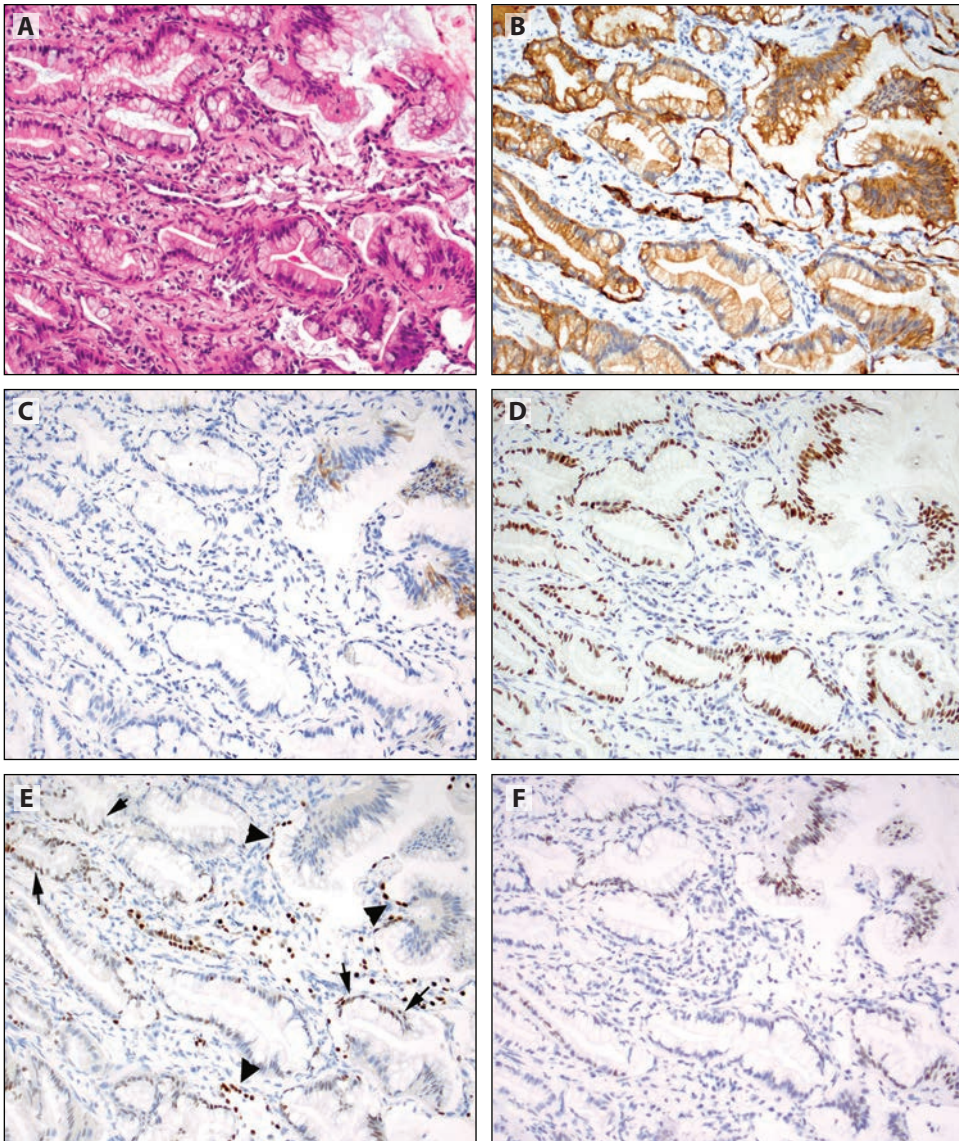


Figura 13-1. (A) Ejemplo de adenocarcinoma mucinoso invasivo que muestra células columnares altas con mucina citoplasmática abundante y células caliciformes dispersas en patrones acinar y lepidico. (B) Las células de la lesión son difusamente positivas para citoqueratina 7 (CK7) y (C) focalmente positivas para CK20. (D) Una inmunotinción para factor nuclear 4 alfa de hepatocitos (HNF4a) resalta casi todos los núcleos de las células tumorales, mientras que (E, flechas) las expresiones nucleares del factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y (F) CDX2 se limitan a subgrupos de células tumorales. CK20 y CDX2 tienden a colocalizarse. Cabe anotar que (E, puntas de flecha) los neumocitos de fondo exhiben una fuerte expresión nuclear de TTF1.

intestinal, CDX2, son positivos en el 40 % al 50 % de los AMI (Yatabe et al., 2019). Cabe anotar que la mayoría de los AMI, en particular aquellos que carecen de expresión de TTF1, reaccionan al factor nuclear 4 alfa de hepatocitos (HNF4a), que es otro factor de transcripción nuclear que se encuentra a nivel hepatoiliar y en los tractos GI (Sugano et al., 2013).

¿Las inmunotinciones son útiles en el diagnóstico del adenocarcinoma mucinoso invasivo?

Los adenocarcinomas mucinosos de sitios diferentes del pulmón pueden mostrar un patrón de crecimiento lepidico cuando hacen metástasis en el pulmón; de este modo, puede ser

sumamente difícil diferenciar entre el AMI pulmonar primario y estos tumores únicamente con base en la morfología. Desafortunadamente, es posible que la IHQ no sea útil en este contexto, dado que el AMI a menudo expresa marcadores de diferenciación intestinal, incluyendo CDX2 y HNF4α junto con CK7, los cuales son marcadores comunes de los tumores primarios pancreatobiliares y del tracto GI superior. No obstante, una expresión significativa de TTF1 respalda la existencia de un tumor primario pulmonar.

Por otro lado, la IHQ puede ser útil para diferenciar al AMI de entidades no malignas. Por ejemplo, el AMI comprende una fracción significativa de los cánceres de pulmón que se desarrollan en pacientes con neumonía intersticial usual (UIP) (Masai et al., 2016; Calio et al., 2017), y la metaplasia mucinosa, que a menudo está asociada con la metaplasia peribronquiolar/bronquioloectasia por tracción que se encuentra en la UIP, puede imitar al AMI. Dada su morfología habitualmente bien diferenciada, el diagnóstico de AMI puede ser difícil en un fondo de fibrosis intersticial y/o en una muestra de biopsia pequeña. En estos casos podría ser útil un panel de tinciones para TTF1 (\pm napsina A), p40 y HNF4α. Las proliferaciones no neoplásicas retienen células basales que expresan p40 y no expresan HNF4α. El tumor papilar muconodular ciliado es otro diagnóstico diferencial importante debido a su acumulación abundante de mucina, a la presencia de células mucinosas y a diversos patrones de crecimiento que se pueden asemejar bastante al AMI (Lu y Yeh, 2019). La ausencia de células basales p40+, junto con la falta de cilios en un grupo de células mucinosas que recubren las paredes alveolares o las glándulas en formación, respalda el diagnóstico de AMI (Chang et al., 2018).

Las [figuras 13-2E](#) y [F](#) muestran otro ejemplo de AMI en un paciente con fibrosis intersticial. Existen glándulas mucinosas con un contorno levemente irregular, pero sin atipia citológica evidente en un fondo de estroma fibroso y unos pocos focos de metaplasia peribronquiolar con o sin mucina ([figura 13-2E](#), flechas). Una inmunotinción para p40 revela núcleos positivos en los bronquiolos y el parénquima alveolar con metaplasia peribronquiolar ([figura 13-2F](#)), mientras que los grupos de glándulas mucinosas son completamente negativos para p40 (ausencia de células basales), lo que respalda el diagnóstico de AMI.

Resumen de respuesta

El AMI expresa a menudo marcadores de diferenciación intestinal, como CDX2 y HNF4α, junto con la CK7, mientras que la expresión de TTF1 y napsina A es limitada; por ende, la diferenciación entre AMI y metástasis de un tumor primario extrapulmonar, en particular un tumor primario GI superior o pancreatobiliar, puede ser sumamente difícil sin la correlación clinicopatológica. Por otro lado, la IHQ puede ser útil para diferenciar al AMI de entidades no malignas y del adenocarcinoma de pulmón no AMI.

Adenocarcinoma coloide

El adenocarcinoma coloide del pulmón, caracterizado por acumulaciones de mucina con epitelio escaso, es un tumor muy poco común que comparte características histológicas similares con los adenocarcinomas mucinosos del tracto GI, del ovario y de mama. Por esta razón, podría ser necesaria la IHQ para apoyar el diagnóstico de un tumor primario de pulmón.

¿Cuál es el perfil inmunológico del adenocarcinoma coloide de pulmón?

Los adenocarcinomas coloides del pulmón a menudo muestran reactividad a los marcadores de adenocarcinoma tanto de pulmón como intestinales ([figura 13-3](#)). La expresión de TTF1, napsina A y CK7 se observa en el 60 %, 50 % y 90 % de los tumores, respectivamente, mientras que la expresión de CDX2 y CK20 está presente en el 70 % y 90 %, respectivamente (Rossi et

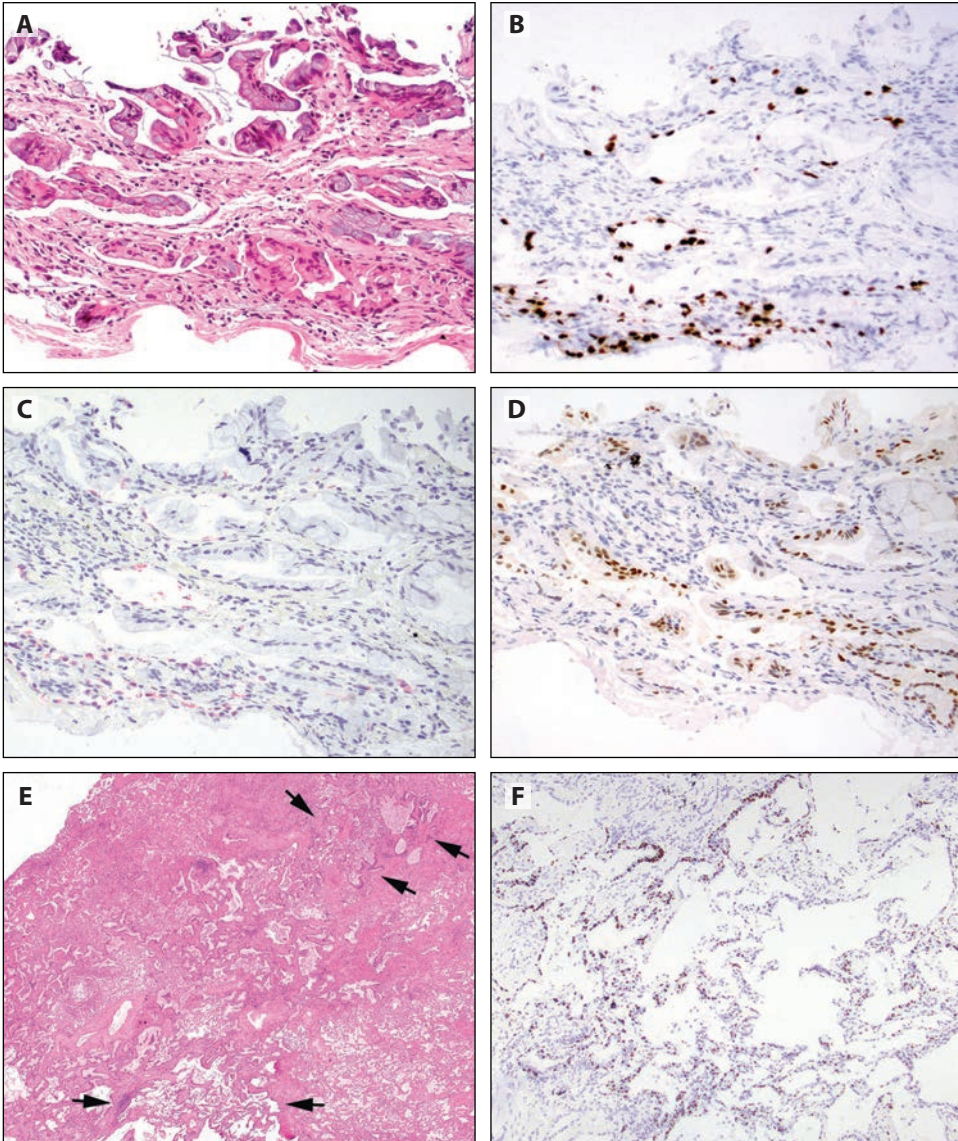


Figura 13-2. (A-D) Biopsia por aguja gruesa con adenocarcinoma mucinoso invasivo que muestra racimos de células mucinosas con atipia citológica leve que recubren las paredes alveolares o en (A) el fondo de un estroma levemente fibroso. Una inmunotinción para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) resalta los neumocitos, mientras que las células mucinosas no son reactivas a (B) TTF1 o (C) p40. Por el contrario, la gran mayoría de las células mucinosas muestran (D) expresión nuclear de factor nuclear 4 alfa de hepatocitos (HNF4a), lo que confirma el diagnóstico de adenocarcinoma mucinoso invasivo. (E y F) Otro ejemplo de adenocarcinoma mucinoso invasivo de un paciente con fibrosis intersticial. Un nódulo subpleural mal definido, de 1,5 cm, consiste en glándulas mucinosas con un contorno levemente irregular, aunque sin atipia citológica evidente en un fondo de estroma fibroso, y unos pocos focos de metaplasia peribronquiolar con o sin mucina (E, flechas). Una inmunotinción para p40 revela núcleos positivos en los bronquiolos y el parénquima alveolar con metaplasia peribronquiolar (F), mientras que los grupos de glándulas mucinosas son completamente negativos para p40 (ausencia de células basales), lo que confirma el diagnóstico de adenocarcinoma mucinoso invasivo.

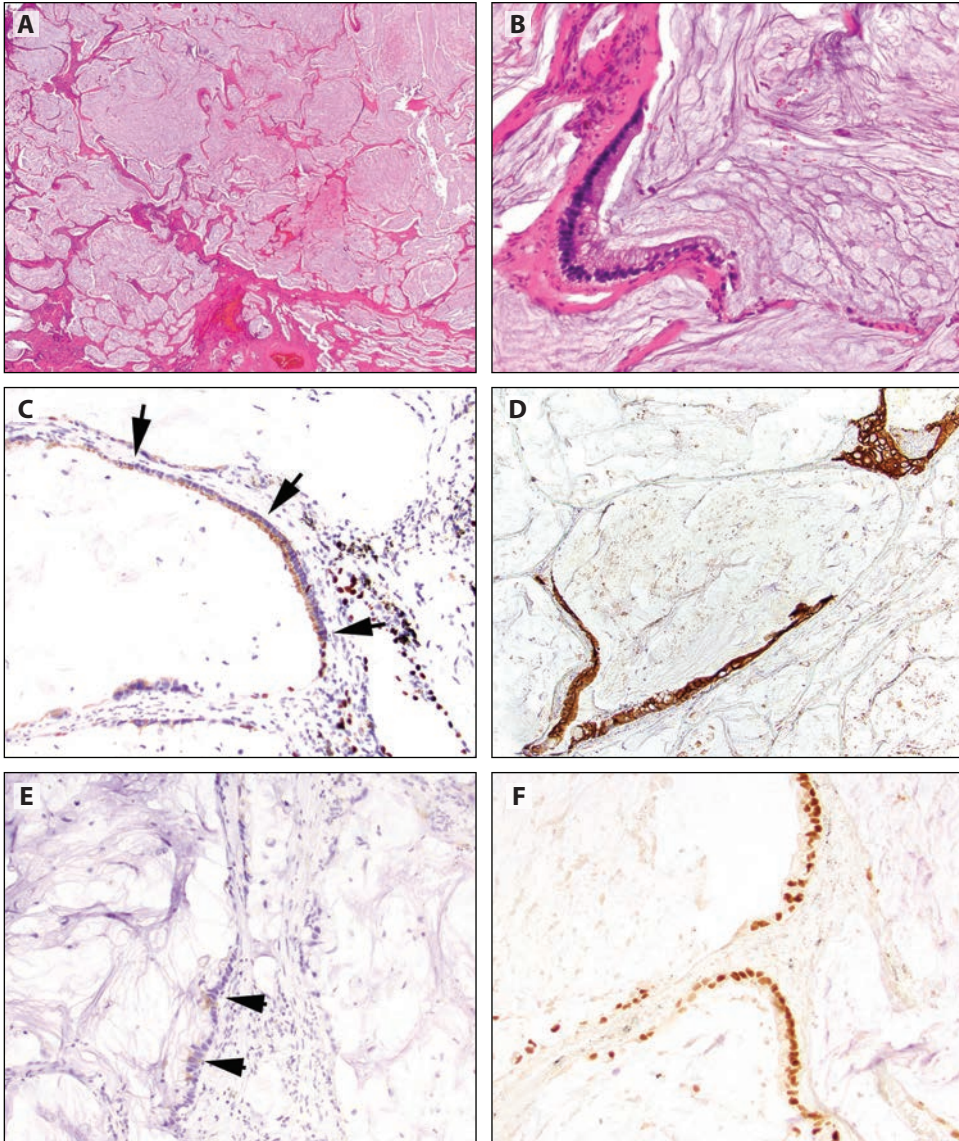


Figura 13-3. (A) Un adenocarcinoma coloide del pulmón consiste en una acumulación de mucina que expande y destruye a los alvéolos con (B) focos poco frecuentes y dispersos de células mucinosas que recubren focalmente los tabiques alveolares. (C, flechas) La inmunohistoquímica muestra una expresión nuclear negativa para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) en las células tumorales, mientras que hay una expresión citoplasmática débil. Esto último no ayuda en el diagnóstico diferencial. (D) El tumor exhibe una expresión difusa de CK7 y (E, puntas de flecha) una expresión muy focal de CK20. (F) CDX2 también resalta la mayoría de los núcleos tumorales. Este patrón mixto de expresión de marcadores pulmonares e intestinales es característico del adenocarcinoma coloide de pulmón.

al., 2004; Zenali et al., 2015; Yatabe et al., 2019). Un panel que incluya estos marcadores junto con GATA3 y el receptor de estrógeno (ER) (en el caso del carcinoma coloide de mama) y PAX8 (en el caso del carcinoma mucinoso de ovario) podría ser útil para diferenciar un tumor primario de pulmón de una metástasis de otro sitio. Desafortunadamente, la IHQ no siempre permite obtener una conclusión precisa en esta situación, puesto que no todos los tumores metastásicos replican el patrón de expresión del sitio primario. Por ende, la correlación clinicopatológica siempre es importante.

Resumen de respuesta

Un panel de IHQ (CK7, CK20, TTF1, napsina A, CDX2 y otros marcadores específicos de sitios diferentes del pulmón) podría ser útil para diferenciar el adenocarcinoma coloide de pulmón del adenocarcinoma mucinoso metastásico de un sitio extrapulmonar.

Adenocarcinoma entérico

El adenocarcinoma entérico es una variante poco frecuente del adenocarcinoma de pulmón que se asemeja al adenocarcinoma que se origina en el colon y el recto. Por lo tanto, el diagnóstico requiere la exclusión de metástasis de un sitio primario en el colon o el recto (Travis et al., 2015). La correlación clinicopatológica, junto con los análisis IHQ, son útiles en este caso.

¿Cuál es el mejor panel de IHQ para diferenciar el adenocarcinoma entérico de pulmón del adenocarcinoma colorrectal metastásico?

Como era de esperarse, el adenocarcinoma entérico pulmonar expresa a menudo marcadores intestinales. La mitad de los tumores expresa CK20 y CDX2, mientras que la expresión de TTF1 y napsina A está limitada a un tercio de los casos. En este contexto, la inclusión de CK7 y SATB2 en un panel IHQ puede ser útil, aunque los datos sugieren que aún se carece de la suficiente capacidad para discriminarlos. Mientras que la CK7 usualmente es fuerte y difusa en cerca del 85 % de los adenocarcinomas de pulmón, pero es débil y focal en hasta el 27 % de los adenocarcinomas colorrectales, lo contrario se observa de manera habitual con SATB2; fuerte y difuso en el 85 % de los casos de cáncer colorrectal (CRC), débil y focal en aproximadamente 14 % de los adenocarcinomas pulmonares (Lin et al., 2013; Jurmeister et al., 2019; Gu et al., 2019; Zhang et al., 2019; Bian et al., 2017; Matsushima et al., 2017).

Resumen de respuesta

Un panel de IHQ (que incluye CK7 y SATB2) puede ayudar a diferenciar el adenocarcinoma entérico pulmonar del adenocarcinoma colorrectal metastásico ([figura 13-4](#)).

Adenocarcinoma fetal

El adenocarcinoma fetal del pulmón se asemeja a la fase pseudoglandular del pulmón fetal, y se caracteriza por estructuras glandulares complejas compuestas por células no ciliadas ricas en glucógeno. Se han descrito adenocarcinomas fetales de bajo y de alto grado. La forma de bajo grado exhibe atipia nuclear baja y formación de mórulas en un fondo de estroma fibromixoide laxo, mientras que la forma de alto grado muestra una atipia nuclear más prominente, falta de mórulas, necrosis y transición a un componente menor de adenocarcinoma convencional (Travis et al., 2015). Podría ser necesaria la IHQ para diferenciar el adenocarcinoma fetal del pulmón del adenocarcinoma endometrial metastásico.

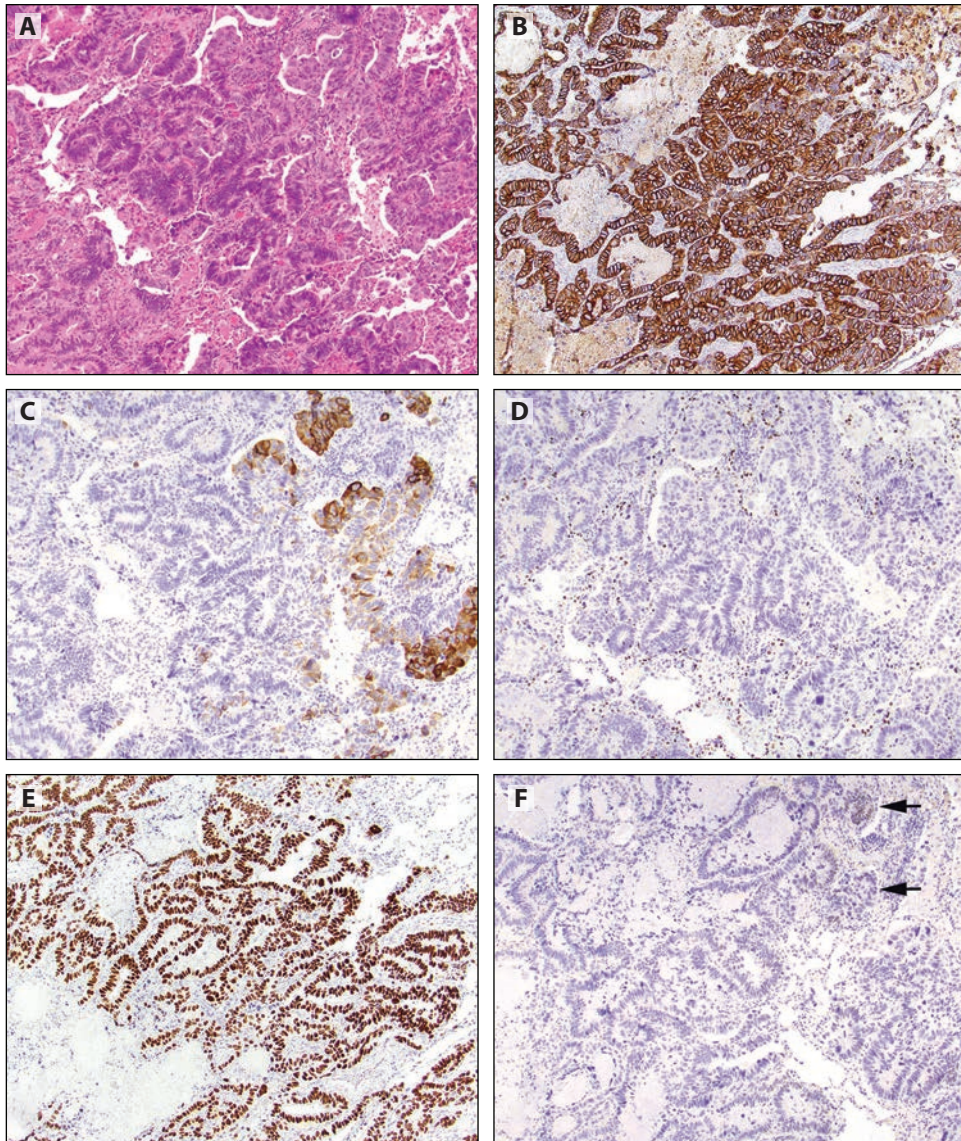


Figura 13-4. Ejemplo de adenocarcinoma entérico. **(A)** El tumor consiste en células columnares altas con núcleos hiper cromáticos que forman glándulas. También es evidente la necrosis luminal. **(B)** Casi todas las células tumorales son reactivas a la citoqueratina 7 (CK7), mientras que **(C)** una fracción de células tumorales exhibe expresión de CK20, y **(D)** el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) solo resalta los neumocitos atrapados, pero no las células tumorales. **(E)** La gran mayoría de las células tumorales también son reactivas a CDX2, pero **(F, flechas)** solo una pequeña fracción muestra una expresión débil de SATB2. Este patrón de expresión de CK7 y SATB2 es consistente con un tumor primario de pulmón.

¿Cuáles son los perfiles inmunológicos de los adenocarcinomas fetales de pulmón de bajo y alto grado?

Los adenocarcinomas fetales de bajo grado expresan TTF1 y muestran una localización nuclear aberrante de β -catenina, común en las mórulas, mientras que la tinción de membrana citoplasmática de la β -catenina se preserva en la forma de alto grado, y la expresión de TTF1 se aprecia solo en el 50 % de los tumores de alto grado (figuras 13-5 y 13-6). Más del 90 % de los tumores de bajo grado albergan células neuroendocrinas, las cuales son inmunorreactivas a la sinaptofisina y/o cromogranina, mientras que solo el 50 % de los tumores de alto grado

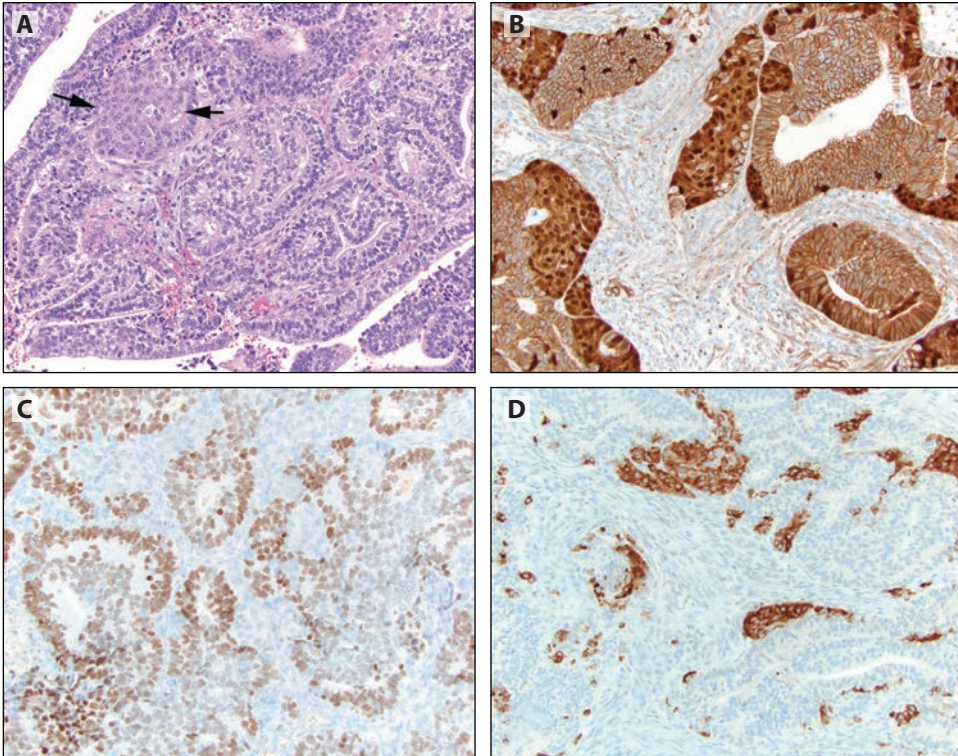


Figura 13-5. (A, flechas) Ejemplo de adenocarcinoma fetal de bajo grado del pulmón, caracterizado por estructuras glandulares complejas compuestas por células no ciliadas ricas en glucógeno y formación de mórulas que se asocia con (B) expresión nuclear de β -catenina. (C) La mayoría de las células tumorales exhiben tinción nuclear de factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) de diversas intensidades, y (D) la sinaptofisina resalta los racimos dispersos de células neuroendocrinas en el tumor. Las células tumorales fueron negativas para el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y PAX8 (no se muestra en la imagen).

contienen dichas células (Nakatani et al., 2002, 2004; Morita et al., 2013; Suzuki et al., 2015). Curiosamente, los adenocarcinomas fetales de alto grado expresan con frecuencia proteínas oncofetales, por ejemplo, α -fetoproteína, glipicano 3 y/o proteína tipo Sal 4 (SALL4) (Morita et al., 2013; Suzuki et al., 2015). Ni la forma de bajo grado ni la de alto grado son inmunorreactivas a ER, receptor de progesterona (PR) o PAX8, cuyas expresiones se aprecian normalmente en el adenocarcinoma endometrial.

Resumen de respuesta

El adenocarcinoma fetal de bajo grado se caracteriza por la localización nuclear aberrante de β -catenina, común en las mórulas, mientras que el adenocarcinoma fetal de alto grado suele expresar proteínas oncofetales, como la α -fetoproteína, el glipicano 3 y/o SALL4. Además, podría ser necesario un panel de IHQ, por ejemplo, TTF1 y PAX8, para diferenciar el adenocarcinoma fetal de pulmón del adenocarcinoma endometrial metastásico.

Conclusiones

Un panel de IHQ puede ser útil para diagnosticar el adenocarcinoma coloide del pulmón o el adenocarcinoma entérico pulmonar (CK7, CK20, TTF1, napsina A, CDX2 y SATB2), así como para diferenciar el adenocarcinoma fetal del adenocarcinoma endometrial metastásico (TTF1 y PAX8), mientras que la diferenciación entre el AMI y la metástasis de un sitio pancreatobiliar o del tracto GI superior puede ser sumamente difícil con base únicamente

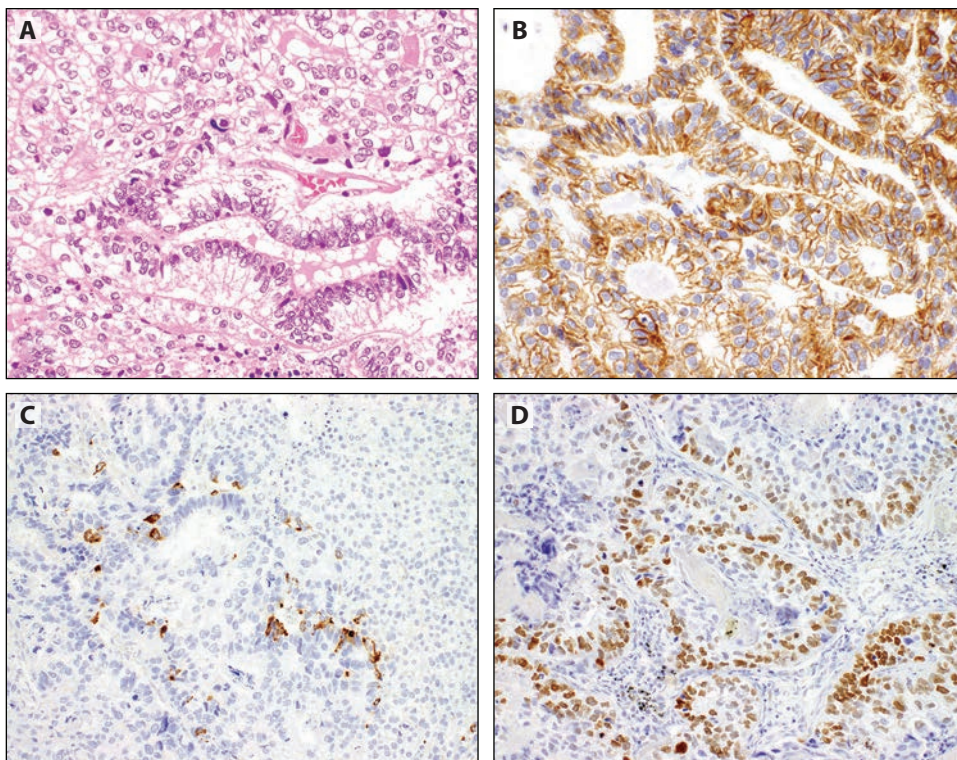


Figura 13-6. (A) Adenocarcinoma fetal de pulmón de alto grado que muestra células no ciliadas ricas en glucógeno con atipia nuclear prominente que forman estructuras glandulares complejas sin mórulas. (B) La expresión de β -catenina se preserva en un patrón membranoso citoplasmático. (C) La cromogranina A resalta las células neuroendocrinas dispersas, y también se observa expresión de (D) SALL4 en una fracción de las células tumorales, mientras que la expresión del receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y PAX8 (no se muestra en la imagen) está ausente. (Imágenes cortesía del Dr. Yukio Nakatani)

en la morfología y la IHQ. Por el contrario, la IHQ con TTF1, p40 y/o HNF4 α puede ser útil en el diagnóstico de AMI cuando el tejido de la lesión es limitado, o cuando se encuentran entidades no malignas en el diagnóstico diferencial.

Referencias

- Bian T, Zhao J, Feng J, et al. Combination of cadherin-17 and SATB homeobox 2 serves as potential optimal makers for the differential diagnosis of pulmonary enteric adenocarcinoma and metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(38):63442-63452.
- Calio A, Lever V, Rossi A, et al. Increased frequency of bronchiolar histotypes in lung carcinomas associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Histopathology*. 2017;71(5):725-735.
- Chang JC, Montecalvo J, Borsu L, et al. Bronchiolar adenoma: expansion of the concept of ciliated mucinodular papillary tumors with proposal for revised terminology based on morphologic, immunophenotypic, and genomic analysis of 25 cases. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(8):1010-1026.
- Gu L, Wang XZ, Wen W, et al. Clinical analysis of 23 patients pathologically diagnosed with primary and secondary pulmonary enteric adenocarcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2019;132(11):1368-1369.
- Jurmeister P, Scholer A, Arnold A, et al. DNA methylation profiling reliably distinguishes pulmonary enteric adenocarcinoma from metastatic colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2019;32(6):855-865.
- Lin D, Zhao Y, Xing X. Pulmonary enteric adenocarcinoma with villin brush border immunoreactivity: a case report and literature review. *J Thorac Dis*. 2013;5(1):E17-20.
- Lu YW, Yeh YC. Ciliated mucinodular papillary tumors of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(1):135-139.

- Masai K, Tsuta K, Motoi N, et al. Clinicopathological, immunohistochemical, and genetic features of primary lung adenocarcinoma occurring in the setting of usual interstitial pneumonia pattern. *J Thorac Oncol*. 2016;11(12):2141-2149.
- Matsushima J, Yazawa T, Suzuki M, et al. Clinicopathological, immunohistochemical, and mutational analysis of pulmonary enteric adenocarcinoma: usefulness of SATB2 and β -catenin immunostaining for differentiation from metastatic colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2017;64:179-185.
- Morita S, Yoshida A, Goto A, et al. High-grade lung adenocarcinoma with fetal lung-like morphology clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 17 cases. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(6):924-932.
- Nakatani Y, Masudo K, Miyagi Y, et al. Aberrant nuclear localization and gene mutation of beta-catenin in low-grade adenocarcinoma of fetal lung type: up-regulation of the Wnt signaling pathway may be a common denominator for the development of tumors that form morules. *Mod Pathol*. 2002;15(6):617-624.
- Nakatani Y, Miyagi Y, Takemura T, et al. Aberrant nuclear/cytoplasmic localization and gene mutation of beta-catenin in classic pulmonary blastoma: beta-catenin immunostaining is useful for distinguishing between classic pulmonary blastoma and a blastomatoid variant of carcinosarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(7):921-927.
- Rossi G, Murer B, Cavazza A, et al. Primary mucinous (so-called colloid) carcinomas of the lung: a clinicopathologic and immunohistochemical study with special reference to CDX-2 homeobox gene and MUC2 expression. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(4):442-452.
- Sugano M, Nagasaka T, Sasaki E, et al. HNF4 α as a marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):211-218.
- Suzuki M, Yazawa T, Ota S, et al. High-grade fetal adenocarcinoma of the lung is a tumour with a fetal phenotype that shows diverse differentiation, including high-grade neuroendocrine carcinoma: a clinicopathological, immunohistochemical and mutational study of 20 cases. *Histopathology*. 2015;67(6):806-816.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. *WHO Classification of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.
- Zenali MJ, Weissferdt A, Solis LM, et al. An update on clinicopathological, immunohistochemical, and molecular profiles of colloid carcinoma of the lung. *Hum Pathol*. 2015;46(6):836-842.
- Zhang J, Xiang C, Han Y, et al. Differential diagnosis of pulmonary enteric adenocarcinoma and metastatic colorectal carcinoma with the assistance of next-generation sequencing and immunohistochemistry. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(1):269-279.

Marcadores inmunitarios para otros tumores poco comunes

14

Por Anja C. Roden y Yuko Minami

Introducción

Además de varios tumores que se analizaron en los capítulos precedentes, otros tumores primarios poco comunes se presentan en el tórax, los cuales varían desde lesiones benignas, como los adenomas bronquiales, hasta neoplasias malignas, como el carcinoma con proteína nuclear en el testículo (NUT) y los tumores de tipo salival. Su diagnóstico oportuno es importante para la atención y el tratamiento del paciente y, en un subgrupo de estos tumores, para el reclutamiento temprano en ensayos clínicos (por ejemplo, inhibidores de la familia del bromodominio y del dominio extraterminal [BET] para el tratamiento de carcinomas NUT [Salati et al., 2019]). Algunas de estas neoplasias, como los adenomas pulmonares o los neumocitomas esclerosantes, se diagnostican casi por completo con hematoxilina y eosina (H&E), pero otras requieren de inmunotinciones para establecer el diagnóstico o para confirmar los resultados obtenidos con H&E, en especial en biopsias más pequeñas. Además, algunos tumores pueden ser difíciles de diferenciar de los imitadores morfológicos; el adenocarcinoma muchas veces está incluido en el diagnóstico diferencial para adenoma alveolar, neumocitoma esclerosante o adenoma bronquiolar/tumor papilar muconodular ciliado (CMPT). Algunos de estos tumores están definidos por alteraciones genéticas ([tabla 14-1](#)). Aun así, la inmunohistoquímica (IHQ) desempeña un papel importante en ciertas circunstancias.

¿La IHQ puede ayudar a diagnosticar el adenoma alveolar?

El factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1), la panqueratina, el antígeno de membrana epitelial (EMA) y la proteína surfactante A (SP-A) resaltan la capa simple de neumocitos tipo II blandos, cuboides o aplanados ([figura 14-1B](#), *flecha*), los cuales recubren los quistes y se encuentran sobre el estroma abundante de células fusiformes. Estas células estromales ([figura 14-B](#), *punta de flecha*) pueden expresar CD34 y posiblemente S100 y actina de músculo liso (SMA). Por lo general, los adenomas alveolares son un diagnóstico de H&E, pero la IHQ se puede usar para confirmar el diagnóstico o para diferenciar el tumor de los linfangiomas, los cuales carecen de células de recubrimiento quístico positivas para queratina o del neumocitoma esclerosante. En contraste con el adenoma alveolar, en donde el TTF1 solo tiñe las células de recubrimiento quístico, en el

Tabla 14-1. Alteraciones genéticas que son altamente específicas para tumores torácicos poco frecuentes

Neoplasia	Alteración genética	Tumores con alteración genética, %	Anticuerpo dirigido contra el oncogén
Carcinoma mucoepidermoide broncopulmonar	t(11;19)(q21;p13) CRCT1-MAML2 ^a	67-100	Ninguno
Carcinoma NUT	t(15;19)(q14;p13.1) <i>BRD4-NUT</i> ^b <i>BRD3-NUT</i> Fusiones variantes de NUT con otros genes no contentivos de BRD (por ejemplo, <i>NDSD3</i> , <i>ZNF532</i>) ^c	70-86 (BRD4-NUT)	NUT (clon C52B1)
Carcinoma adenoide quístico ^d	t(6;9)(q22-23;p23-24) MYB-NFIB	41-50	MYB (59 %) ^e

Abreviaturas: BRD = proteína que contiene bromodominio y de dominio extraterminal (BET); MYB = protooncogén de mieloblastosis, factor de transcripción; NUT = proteína nuclear en el testículo.

^a Roden et al., 2014; Achcar Rde et al., 2009; Huo et al., 2015.

^b French et al., 2003; Chau et al., 2016.

^c French et al., 2014; Alekseyenko et al., 2017.

^d Roden et al., 2015; Brill et al., 2011.

^e Vallonhail et al., 2017; Poling et al., 2017.

neumocitoma esclerosante tanto las células luminales como las estromales expresan TTF1 (véase la sección “¿Son útiles los marcadores inmunitarios para diferenciar el neumocitoma esclerosante del adenocarcinoma?”) (Sak et al., 2007; Burke et al., 1999; De Rosa et al., 2012).

Resumen de respuesta

Aunque se trata principalmente de un diagnóstico de H&E, la IHQ puede ser valiosa para resaltar los neumocitos neoplásicos y el estroma mesenquimal del adenoma alveolar ([figura 14-1](#)).

¿La IHQ del p40 tiene una función en el diagnóstico del CMPT que permite diferenciarlo del adenocarcinoma?

Los marcadores de células basales asociados con diferenciación escamosa, entre ellos el p40, p63, y la citoqueratina 5/6 (CK5/6), resaltan una capa intacta de células basales ([figura 14-2B](#), *flecha*) por debajo de las células columnares de la lesión, lo que ayuda a diferenciar los CMPT de los adenocarcinomas que carecen de una capa de células basales. Ki-67 muestra un bajo índice proliferativo con valores reportados de menos del 1 % a menos del 5 % de tinción de los núcleos de las células tumorales en el CMPT, y un solo caso del 10 % (Lu y Yeh, 2019; Shao et al., 2019, Kataoka et al., 2018). MUC5AC y EMA se expresan de manera variable en las células ciliadas. CK7, CK20, TTF1, napsina A y CDX2 por lo general no son útiles en esa distinción debido a que, de manera similar a los adenocarcinomas de pulmón, las células columnares ciliadas ([figura 14-2B](#), *punta de flecha*) y las células caliciformes que son luminales en relación con las células basales en el CMPT, expresan CK7, y la mayoría también son positivas para el TTF1; mientras que CK20, CDX2 y napsina A son por lo general negativos (Shao et al., 2019; Kashima et al., 2019; Lu y Yeh, 2019).

Resumen de respuesta

Los marcadores de células basales, como p40, p63 y CK5/6, ayudan a identificar la capa doble de células epiteliales en el CMPT ([figura 14-2](#)).

¿Cuál es el perfil inmunológico de los carcinomas NUT?

Un subgrupo de carcinomas NUT puede ser negativo para queratinas, marcadores de diferenciación escamosa y otros marcadores ([figura 14-3A-D](#)). Sin embargo, muchos de estos

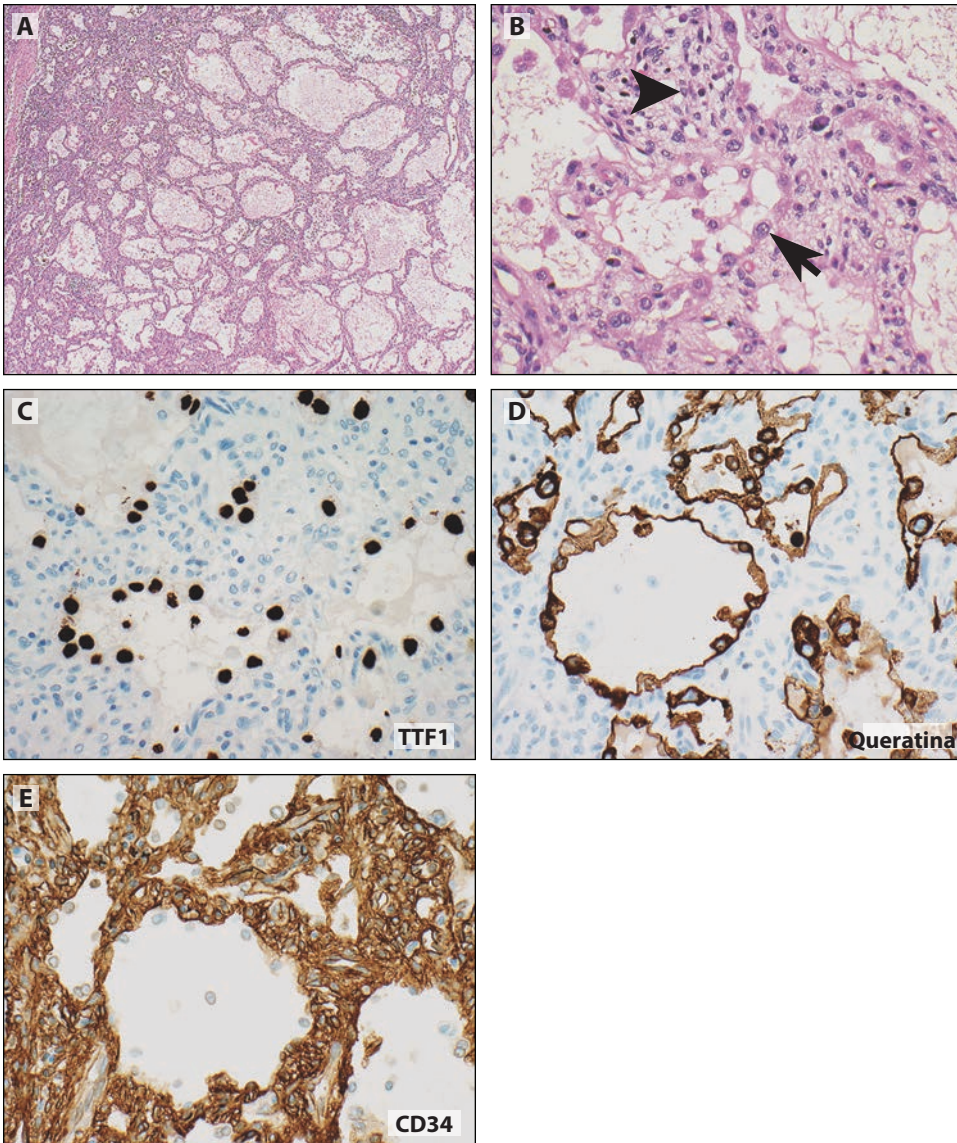


Figura 14-1. Adenoma alveolar. **(A)** La apariencia quística de un adenoma alveolar al usar bajo aumento, **(B)** combinada con la presencia de células en “tachuela” (*flecha*) que recubren los espacios, a pesar de la histología del estroma (*punta de flecha*), podría plantear el diagnóstico diferencial de linfangioma o neumocitoma esclerosante. **(C)** La tinción para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y **(D)** para citoqueratina resalta la diferenciación neumocitaria de las células de recubrimiento. **(E)** Las células intersticiales son negativas para TTF1, mientras que a menudo son positivas para CD34. Aumento **(A)** H&E, $\times 40$; **(B)** H&E, $\times 400$; **(C)** TTF1 (clon SPT24), $\times 400$; **(D)** panqueratina (clones AE1/AE3), $\times 400$; y **(E)** CD34, $\times 400$.

tumores muestran al menos una expresión focal de diversas queratinas, entre ellas la panqueratina (77 %), la queratina OSCAR y la CK7, y marcadores asociados con diferenciación escamosa como p40, p63 (90 %) y CK5/6. También pueden expresar el TTF1, en ocasiones en las mismas células neoplásicas que expresan p63, etc.; una situación que podría indicar que se trata de un carcinoma NUT, aunque esto también se puede evidenciar en adenocarcinomas poco diferenciados (véase el capítulo 8). Algunos carcinomas NUT también expresan EMA (75 %), CD34 y/o CD99 (Evans et al., 2012). La IHQ positiva para NUT es suficiente para hacer el diagnóstico, pero el reordenamiento *NUT* se puede confirmar ([figura 14-4](#)) mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) (French, 2012).

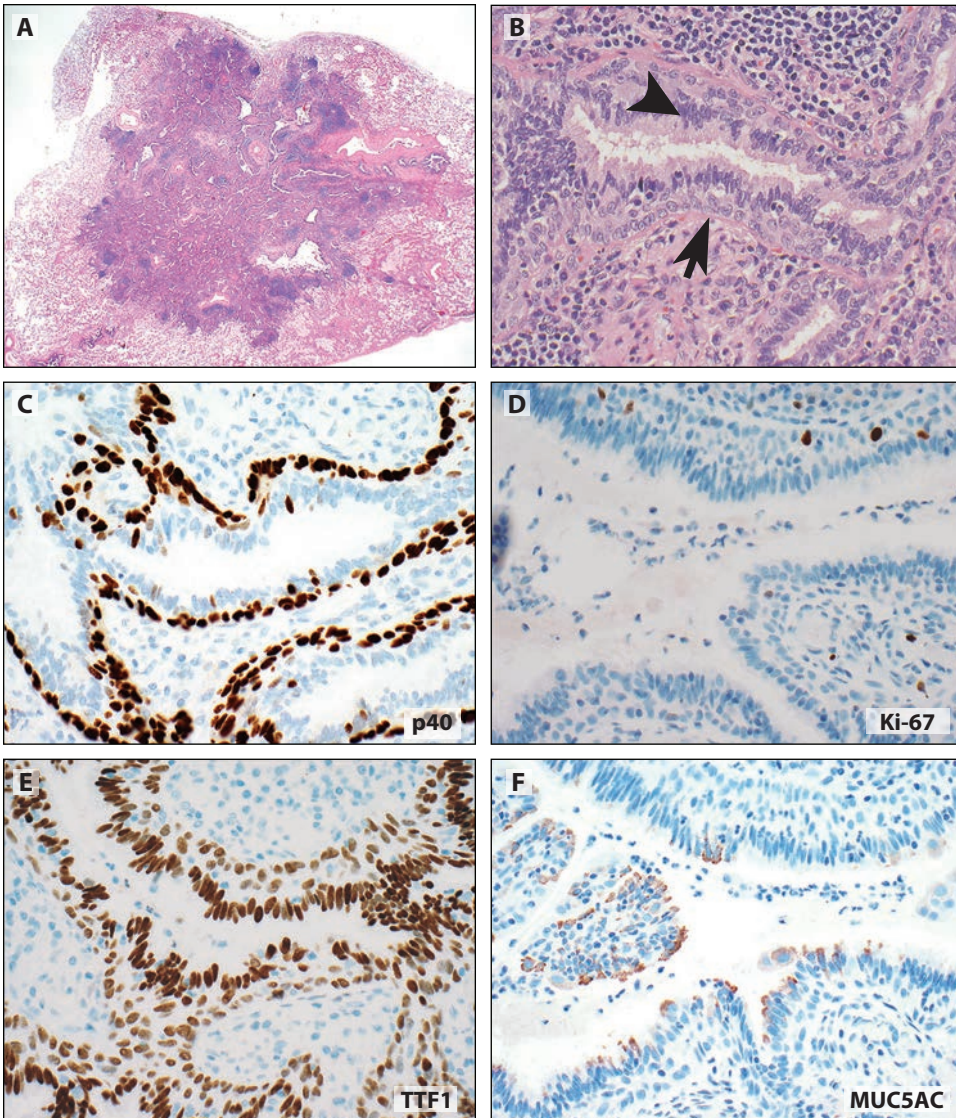


Figura 14-2. Tumor papilar muconodular ciliado. (A) Estos tumores aparecen circunscritos con poca claridad, pero no encapsulados, al usar bajo aumento, y (B) contienen espacios con recubrimiento epitelial (*punta de flecha*) que tienen una doble capa (*flecha*). (C) Esto se puede resaltar con la tinción para p40. Las células de recubrimiento deben tener (C) un índice Ki-67 bajo y (D) son positivas para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1). Las células ciliadas pueden ser positivas para MUC5AC. Aumento (A) H&E, $\times 12.5$; (B) H&E, $\times 400$; (C) p40, $\times 400$; (D) Ki-67, $\times 400$; (E) TTF1 (clon SPT24), $\times 400$; y (F) MUC5AC, $\times 400$.

Resumen de respuesta

Además de la expresión del NUT, a menudo se expresan queratinas y marcadores de células basales, pero también se pueden encontrar el TTF1 y EMA.

¿Cuál es el patrón de expresión de la NUT en los carcinomas NUT?

Resumen de respuesta

Un patrón nuclear moteado en más del 50 % de las células tumorales es característico y diagnóstico del carcinoma NUT (Haack et al., 2009; French, 2018) ([figura 14-4](#)). La inmunotinción del NUT es sensible (87 %) y específica (100 % tras la exclusión del seminoma [French, 2018]).

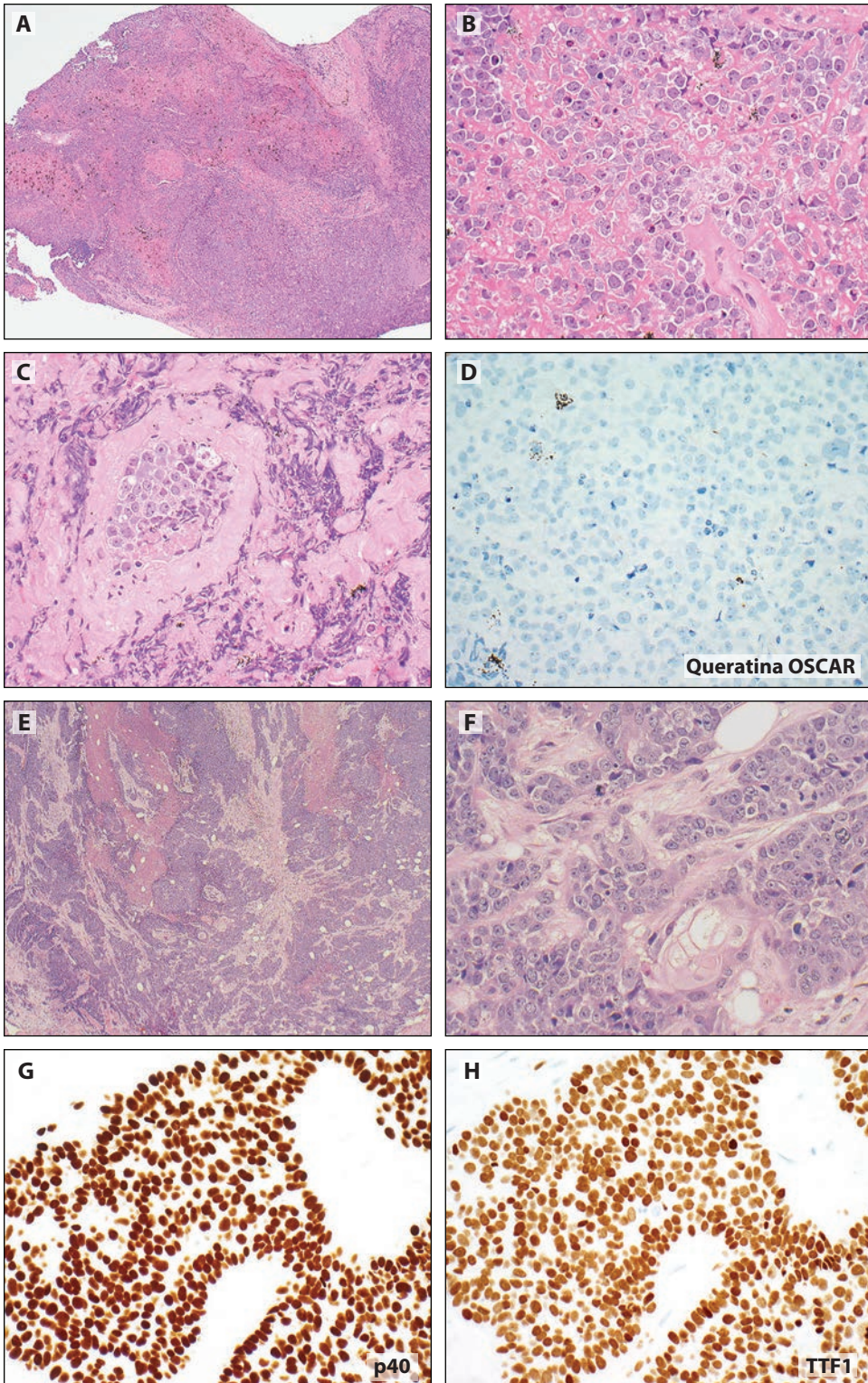


Figura 14-3. Carcinoma con proteína nuclear en el testículo (NUT). **(A)** Este tumor celular se caracteriza por **(E y F)** células epitelioides discohesivas con áreas de estroma hialinizado, necrosis y diferenciación escamosa focal. **(C)** La inmunohistoquímica (IHQ) para citoqueratina puede ser focal o negativa, pero **(G y H)** p40 y el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) pueden ser doble positivos en las mismas células. Aumento **(A y E)** H&E, x40; **(B, C, y F)** H&E, x400; **(D)** queratina (clon OSCAR), x400; **(G)** p40, x400; y **(H)** TTF1 (clon SPT24), x400.

¿Son útiles los marcadores inmunitarios para diferenciar el neumocitoma esclerosante del adenocarcinoma?

El reconocimiento de dos poblaciones celulares diferentes en la H&E —las células cuboides de superficie ([figura 14-5B](#), *flecha*), que se asemejan morfológica e inmunofenotípicamente a los neumocitos tipo II, y las células redondas estromales ([figura 14-5B](#), *punta de flecha*)— es importante para el diagnóstico y para diferenciar este tipo de tumor del adenocarcinoma. Los marcadores que resaltan de manera diferencial a estas dos poblaciones celulares y que, en consecuencia, ayudan en la diferenciación del adenocarcinoma, incluyen la panqueratina (AE1/AE3), napsina A y, si está disponible, la proteína surfactante (SP-A y SP-B), las cuales resaltan selectivamente el componente celular de superficie ([tabla 14-2](#)). A pesar de que se ha mostrado que el receptor de progesterona resalta solo el componente de células redondas en la mayoría de los casos, no fue posible validarlo en un estudio realizado por Rodríguez-Soto et al. (2000). El TTF1 se expresa en ambos componentes y, a pesar de que puede ser útil para el diagnóstico del neumocitoma

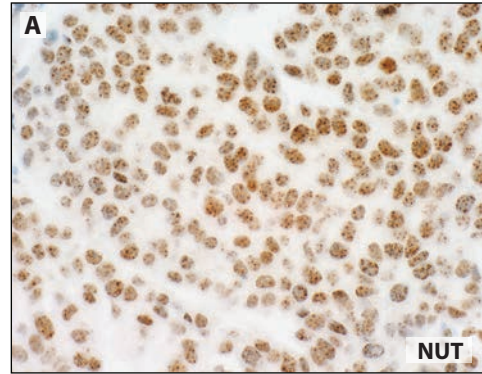


Figura 14-4. Inmunohistoquímica para proteína nuclear en el testículo (NUT). Tinción nuclear en más del 50% de las células, a menudo con patrón moteado. (A) Aumento x600.

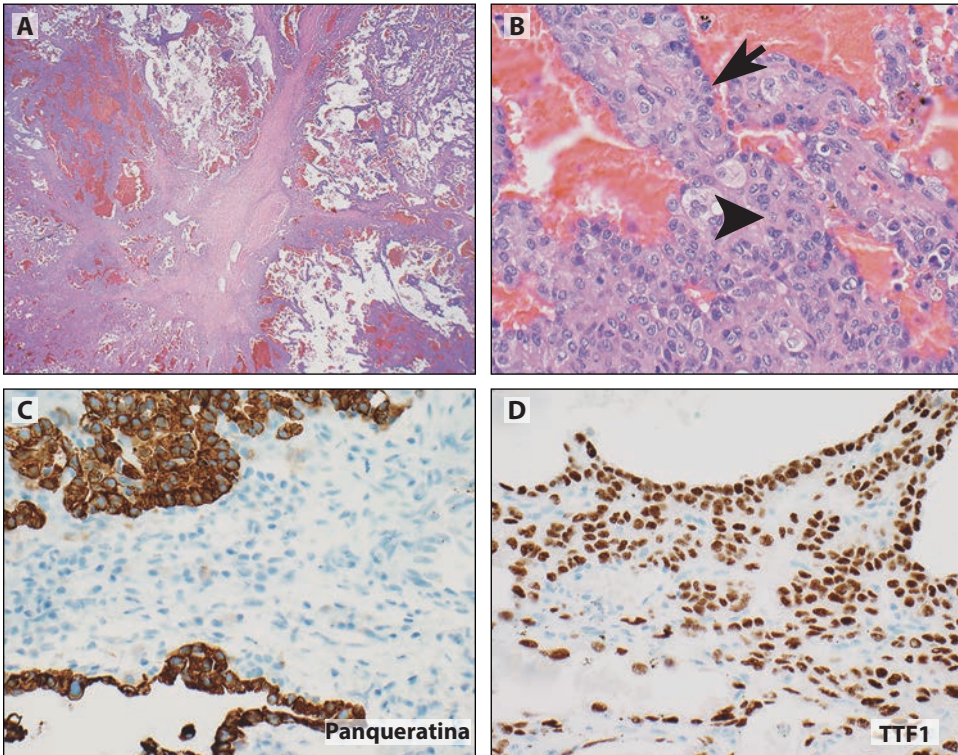


Figura 14-5. Neumocitoma esclerosante. (A) La vista con bajo aumento muestra esclerosis y arquitectura papilar, y al usar un nivel mayor de aumento (B), se observa una población intersticial de células redondas (*punta de flecha*) y un recubrimiento epitelial (*flecha*). (C) La tinción para citoqueratina es positiva solo en las células de recubrimiento, mientras que (D) el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) resalta tanto las células redondas como las células de recubrimiento. Aumento (A) H&E, x40; (B) H&E, x400; (C) panqueratina (clones AE1/AE3), x400; y (D) TTF1 (clon SPT24), x400.

Tabla 14-2. Antígenos expresados por los componentes celulares del neumocitoma esclerosante

Anticuerpo	Células cuboides de superficie	Células redondas estromales
	% de casos con ≥10 % o 1 % de tinción celular ^a	
TTF1	97 ^a -100 ^{b,c}	92 ^a -100 ^{b,c}
Panqueratina	100	1
CAM5.2	73	17
Queratina 903	0	0
CK7	100	31
Pro SP-A, p	92	0
Pro SP-B, p	100	0
Napsina A	100 ^b	17 ^d

Abreviaturas: CK7 = citoqueratina 7; SP-A = proteína surfactante A; SP-B = proteína surfactante B; TTF1 = factor de transcripción tiroideo 1.

^a Clon no proporcionado.

^b Tinción del 1 % de las células.

^c Clon 8G7/G3/1.

^d Entre el 1 % y el 25 % de las células.

Fuente: Devouassoux-Shisheboran et al., 2000; Schmidt et al., 2012.

esclerosante en general, no contribuye en la diferenciación del adenocarcinoma de pulmón (Devouassoux-Shisheboran et al., 2000; Schmidt et al., 2012).

Resumen de respuesta

Las inmunotinciones pueden ser útiles en el diagnóstico del neumocitoma esclerosante al facilitar la identificación de 2 compartimentos celulares con diferentes perfiles inmunológicos; las queratinas y el TTF1 son elementos clave en esta distinción (figura 14-5).

Tumores de tipo glándula salival

¿Son útiles los marcadores inmunitarios en el diagnóstico de los carcinomas mucoepidermoides pulmonares?

El diagnóstico del carcinoma mucoepidermoide de bajo grado normalmente se basa en una tinción de H&E que muestra la presencia de tres tipos celulares: mucoso (figura 14-6B, flecha), epidermoide (figura 14-6B, punta de flecha) y células intermedias, además de la falta de queratinización. De ser necesario, el diagnóstico se puede confirmar mediante estudios de reordenamiento de *MAML2* (tabla 14-1). El diagnóstico puede ser difícil si se trata de biopsias pequeñas o carcinomas mucoepidermoides. En estos casos, las inmunotinciones pueden ayudar debido a que p63, p40 y CK5/6 resaltan el subgrupo epidermoide de células, mientras que el TTF1 y la napsina A son negativos (Roden et al., 2014; Huo et al., 2015). Se puede agregar una tinción para mucina, como la mucicarmina o el azul alcian/ácido peryódico de Schiff (PAS) para resaltar la mucina citoplasmática en las células mucosas. La sensibilidad de p40 puede ser menor en los carcinomas mucoepidermoides pulmonares que la de p63 (Roden et al., 2014). Una vez más, en caso de duda, se deben realizar estudios de reordenamiento de *MAML2* para establecer el diagnóstico (Roden et al., 2014; Huo et al., 2015).

Resumen de respuesta

Aunque su uso solo es limitado, la IHQ para p63, p40 o CK5/6 puede resaltar el componente de células epidermoides (figura 14-6). El TTF1 y la napsina A deben ser negativos.

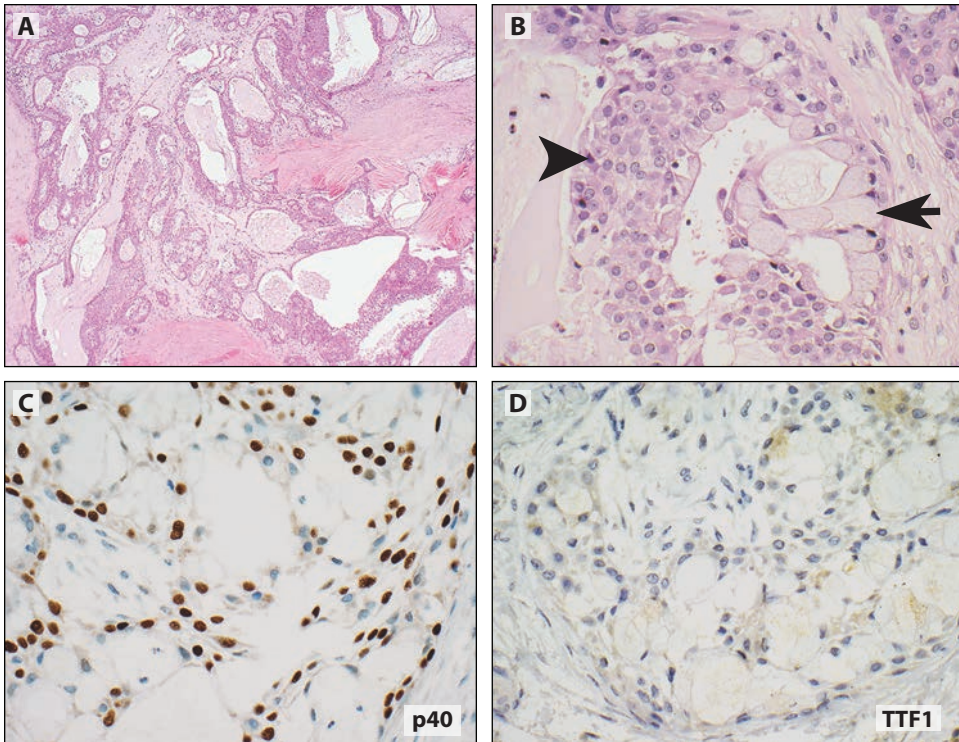


Figura 14-6. Carcinoma mucoepidermoide. Cuando el tumor anidado quístico y sólido variable visto con bajo aumento (A) se examina con un nivel de aumento mayor (B) muestra una población epiteliode uniforme (*punta de flecha*) y células positivas para moco (*flecha*). (C) La inmunohistoquímica (IHQ) para p40 es positiva en una subpoblación de células si se resalta una población dual, pero (D) el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) es negativo en este tumor. Aumento (A) H&E, $\times 40$; (B) H&E, $\times 400$; (C) p40, $\times 400$; y (D) TTF1, $\times 400$.

¿Las inmunotinciones pueden ayudar a diagnosticar los carcinomas adenoides quísticos pulmonares y a diferenciarlos del carcinoma no microcítico y del carcinoma microcítico?

En general, el diagnóstico del carcinoma quístico adenoide se puede lograr mediante tinción con H&E ([figura 14-7](#)). Para confirmar el diagnóstico, las inmunotinciones se deben realizar con células ductales/luminales que usualmente expresan CD117 y EMA, mientras que las células mioepiteliales/periféricas son positivas para p63, S100, SMA, actina específica del músculo (MSA) y calponina (Roden et al., 2015; Namboodiripad, 2014). La queratina no es útil en la diferenciación entre estos dos componentes celulares, ya que se expresa en ambos. CD117, p63 y S100 pueden ser útiles en el establecimiento del diagnóstico de casos difíciles, como el patrón sólido, o en biopsias pequeñas, puesto que estas tinciones resaltan de manera diferencial las dos poblaciones celulares diferentes. Sin embargo, otros carcinomas pulmonares que se encuentran en el diagnóstico diferencial del carcinoma quístico adenoide pueden, al menos focalmente, expresar también estos marcadores. Los estudios del reordenamiento del gen *MYB* y/o una inmunotinción para proteína MYB pueden ser útiles en un subgrupo de casos, aunque esta última aún necesita ser validada en estudios más amplios ([tabla 14-1](#)) (Roden et al., 2015; Brill et al., 2011; Vallonthaiel et al., 2017; Poling et al., 2017).

Resumen de respuesta

Como en el caso del carcinoma mucoepidermoide, el diagnóstico del carcinoma adenoide quístico se basa normalmente en la tinción de H&E. Sin embargo, la IHQ puede ayudar a identificar la población celular dual, especialmente en muestras morfológicamente difíciles, cuando el CD117 puede resaltar las células ductales/luminales, mientras que el p63 y el S100 tiñen las células mioepiteliales/periféricas.

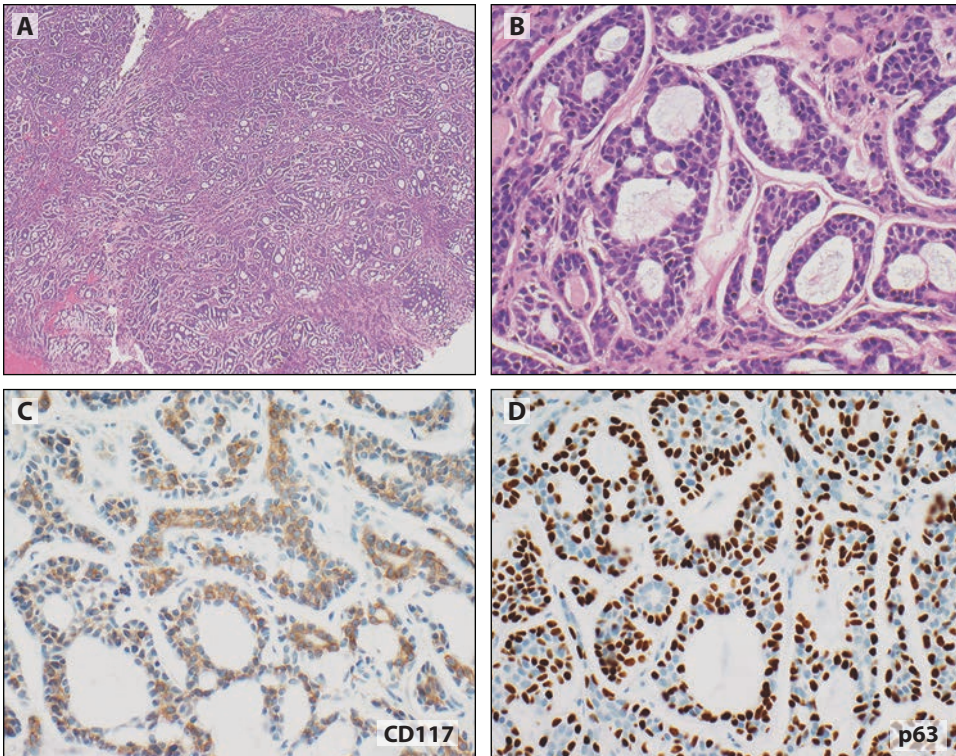


Figura 14-7. Carcinoma adenoide quístico. (A) Esta neoplasia celular tiene estructuras glandulares clásicas bien formadas, las cuales tienen (B) recubrimiento dual (C y D) y están resaltadas por tinción para CD117 y p63. Aumento (A) H&E, $\times 40$; (B) H&E, $\times 400$; (C) CD117, $\times 400$; y (D) p63, $\times 400$.

¿Las inmunotinciones pueden ayudar a diagnosticar el carcinoma epitelial-mioepitelial de pulmón?

Los carcinomas epiteliales-mioepiteliales están conformados por dos poblaciones celulares: células epiteliales ([figura 14-8B-E](#), *flecha*), las cuales son positivas para queratina, y células mioepiteliales ([figura 14-8B-E](#), *punta de flecha*), que son positivas para p63, p40, S100, SMA, MSA y débilmente positivas para queratina, CD117 y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Dimitrijevic et al., 2015; Guleria et al., 2019). En pocos casos, las células epiteliales expresan TTF1 y SP-A (el llamado adenomioepitelioma neumocítico [Chang et al., 2007]). P63, S100, queratina, CD117 y la mucina pueden ser útiles para diferenciar este tumor de los carcinomas mucoepidermoides; no obstante, la diferenciación de los carcinomas adenoides quísticos puede ser difícil debido a que los perfiles inmunológicos son similares ([figura 14-8](#)).

Resumen de respuesta

Al igual que con otros tumores de tipo salival, la IHQ solo ayuda a identificar las diferentes poblaciones celulares que definen las lesiones en el contexto morfológico correcto de la sección teñida con H&E.

Conclusiones

En tumores torácicos poco frecuentes, la IHQ es más útil en el diagnóstico diferencial de neoplasias más comunes. Inevitablemente, puesto que la mayoría de los patólogos no están familiarizados con estas afecciones poco comunes, la IHQ permite obtener ayuda y datos de apoyo. Algunos de los tumores torácicos poco frecuentes están conformados por dos o más

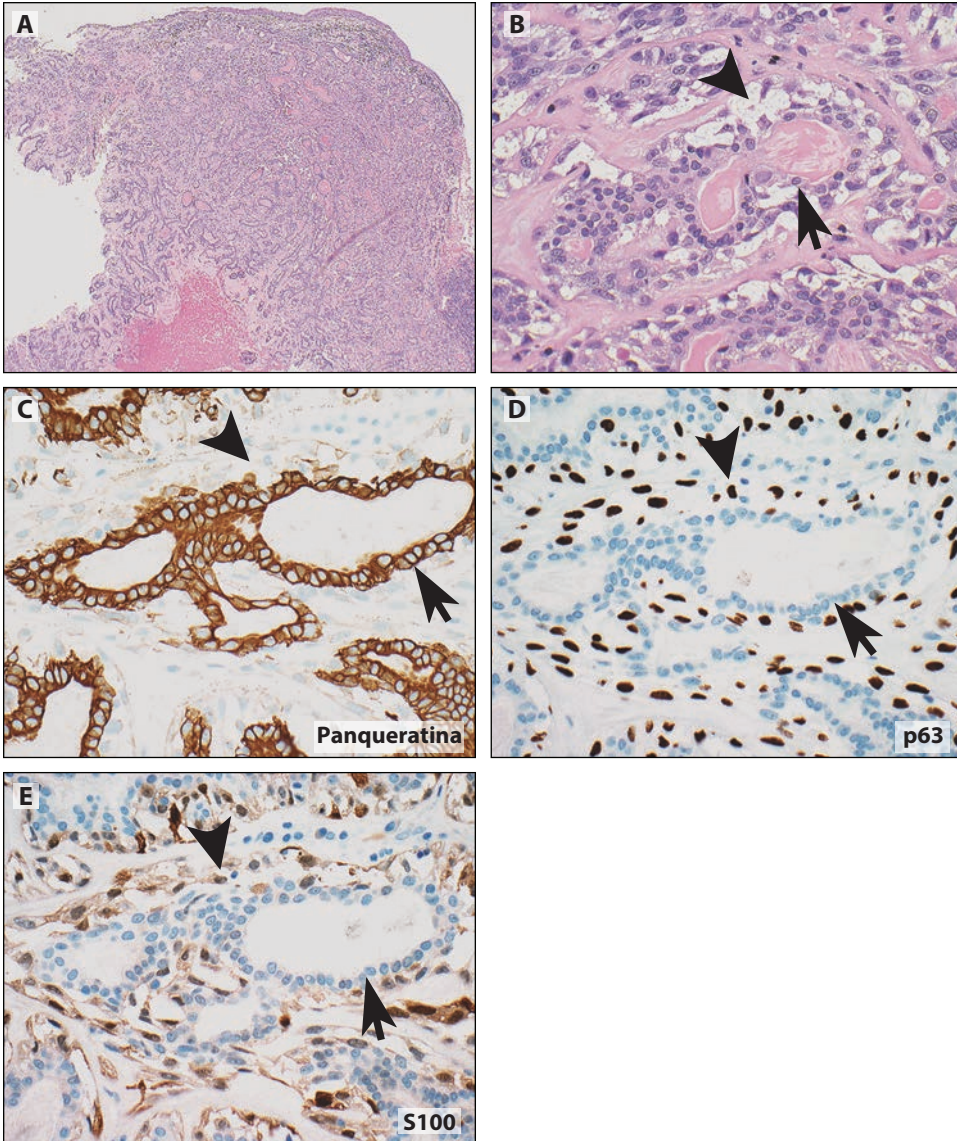


Figura 14-8. Carcinoma epitelial-mioepitelial. (A) Este adenocarcinoma difuso muestra (B) dos capas; la capa externa exhibe una población de capa dual (*flecha*), (B) y la capa interna (*punta de flecha*) muestra células claras consistentes con células mioepiteliales. (C) La panqueratina tiñe la población luminal (*flecha*) pero no la población basal (*punta de flecha*), mientras que (D) p63 y (E) S100 resaltan la población basal (*punta de flecha*) pero no la población luminal (*flecha*). Aumento (A) H&E, $\times 40$; (B) H&E, $\times 400$; (C) panqueratina, $\times 400$ (clones AE1/AE3); (D) p63, $\times 400$; y (E) S100, $\times 400$.

componentes celulares y, aunque usualmente se pueden identificar con H&E en muestras de resección, esto puede ser difícil en biopsias pequeñas, tumores de alto grado o cuando hay un patrón de crecimiento sólido. Además, muchos de estos tumores, como los tumores de tipo glándula salival o los carcinomas NUT, no son específicos del tórax y se pueden observar en otras partes del cuerpo. El inmunofenotipo de estos tumores es idéntico al de los que surgen en otras áreas, por lo que se debe excluir una enfermedad metastásica mediante la correlación clinicorradiológica. No hay marcadores específicos del pulmón o del tórax que puedan ayudar a hacer esta distinción.

Referencias

- Achcar Rde O, Nikiforova MN, Dacic S, et al. Mammalian mastermind like 2 11q21 gene rearrangement in bronchopulmonary mucoepidermoid carcinoma. *Hum Pathol.* 2009;40(6):854-860.
- Alekseyenko AA, Walsh EM, Zee BM, et al. Ectopic protein interactions within BRD4-chromatin complex drives oncogene megadomain formation in NUT midline carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(21):E4184-E4192.
- Brill LB 2nd, Kanner WA, Fehr A, et al. Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. *Mod Pathol.* 2011;24(9):1169-1176.
- Burke LM, Rush WI, Khor A, et al. Alveolar adenoma: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural analysis of 17 cases. *Hum Pathol.* 1999;30(2):158-167.
- Chang T, Husain AN, Colby T, et al. Pneumocytic adenomyoepithelioma: a distinctive lung tumor with epithelial, myoepithelial, and pneumocytic differentiation. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(4):562-568.
- Chau NG, Hurwitz S, Mitchell CM, et al. Intensive treatment and survival outcomes in NUT midline carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2016;122(23):3632-3640.
- De Rosa N, Maiorino A, De Rosa I, et al. CD34 expression in the stromal cells of alveolar adenoma. *Case Rep Med.* 2012;913517.
- Devouassoux-Shisheboran M, Hayashi T, Linnoila RI, et al. A clinicopathologic study of 100 cases of pulmonary sclerosing hemangioma with immunohistochemical studies: TTF1 is expressed in both round and surface cells, suggesting an origin from primitive respiratory epithelium. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(7):906-916.
- Dimitrijevic MV, Tomanovic NR, Jesic SD, et al. Epithelial-myoepithelial carcinoma—a review of clinicopathological and immunohistochemical features. *Arch Iran Med.* 2015;18(4):218-222.
- Evans AG, French CA, Cameron MJ, et al. Pathologic characteristics of NUT midline carcinoma arising in the mediastinum. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(8):1222-1227.
- French CA. NUT carcinoma: clinicopathological features, pathogenesis, and treatment. *Pathol Int.* 2018;68(11):583-595.
- French CA. Pathogenesis of NUT midline carcinoma. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:247-265.
- French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, et al. BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(2):304-307.
- French CA, Rahman S, Walsh EM, et al. NSD3-NUT fusion oncoprotein in NUT midline carcinoma: implications for a novel oncogenic mechanism. *Cancer Discov.* 2014;4(8):928-941.
- Guleria P, Madan K, Kumar S, et al. Pulmonary epithelial myoepithelial carcinoma with papillary architecture: an uncommon morphology of a rare tumor. *Pathology.* 2019;51(4):443-445.
- Haack H, Johnson LA, Fry CJ, et al. Diagnosis of NUT midline carcinoma using a NUT-specific monoclonal antibody. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(7):984-991.
- Huo Z, Wu H, Li J, et al. Primary pulmonary mucoepidermoid carcinoma: histopathological and molecular genetic studies of 26 cases. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143169.
- Kashima J, Hishima T, Tonooka A, et al. Genetic and immunohistochemical analysis of ciliated muconodular papillary tumors of the lung: a report of five cases. *SAGE Open Med Case Rep.* 2019;7:e2050313X19830483.
- Kataoka T, Okudela K, Matsumura M, et al. A molecular pathological study of four cases of ciliated muconodular papillary tumors of the lung. *Pathol Int.* 2018;68(6):353-358.
- Lu YW, Yeh YC. Ciliated muconodular papillary tumors of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(1):135-139.
- Namboodiripad PC. A review: immunological markers for malignant salivary gland tumors. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2014;4(2):127-134.
- Poling JS, Yonescu R, Subhawong AP, et al. MYB labeling by immunohistochemistry is more sensitive and specific for breast adenoid cystic carcinoma than MYB labeling by FISH. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(7):973-979.
- Roden AC, Garcia JJ, Wehrs RN, et al. Histopathologic, immunophenotypic and cytogenetic features of pulmonary mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol.* 2014;27(11):1479-1488.
- Roden AC, Greipp PT, Knutson DL. Histopathologic and cytogenetic features of pulmonary adenoid cystic carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2015;10(11):1570-1575.
- Rodriguez-Soto J, Colby TV, Rouse RV. A critical examination of the immunophenotype of pulmonary sclerosing hemangioma. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(3):442-450.
- Sak SD, Koseoglu RD, Demirag F, et al. Alveolar adenoma of the lung. Immunohistochemical and flow cytometric characteristics of two new cases and a review of the literature. *APMIS.* 2007;115(12):1443-1449.

Salati M, Baldessari C, Bonetti LR, et al. NUT mid-line carcinoma: current concepts and future perspectives of a novel tumour entity. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;144:102826.

Schmidt LA, Meyers JL, McHugh JB. Napsin A is differentially expressed in sclerosing hemangiomas of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(12):1580-1584.

Shao K, Wang Y, Xue Q, et al. Clinicopathological features and prognosis of ciliated muconodular papillary tumor. *J Cardiothorac Surg*. 2019;14(1):143.

Vallonthaiel AG, Jain D, Singh V, et al. c-Myb overexpression in cytology smears of tracheobronchial and pulmonary adenoid cystic carcinomas. *Acta Cytol*. 2017;61(1):77-83.

Marcadores inmunitarios para el sarcoma torácico

15

Por Akihiko Yoshida y Anja C. Roden

Introducción

La cavidad torácica puede albergar diversos tumores con fenotipo sarcomatoso, incluyendo el carcinoma sarcomatoide, el mesotelioma sarcomatoide y el sarcoma verdadero. El análisis diagnóstico comienza con la histología convencional en el contexto clinicorradiológico; sin embargo, en la mayoría de los casos, la inmunohistoquímica (IHQ) es necesaria para la evaluación diagnóstica. El análisis molecular también es útil y, a veces, necesario para el diagnóstico de tumores que albergan anormalidades genéticas específicas, tales como los sarcomas sinoviales (fusión *SS18-SSX*) y los sarcomas de Ewing (fusión *EWSR1-ETS*). Las neoplasias sarcomatoides de la cavidad torácica muy probablemente están relacionadas con carcinomas sarcomatoides o mesoteliomas sarcomatoides. Por lo tanto, el diagnóstico de sarcoma se debe hacer con gran precaución, en particular cuando la morfología y el inmunofenotipo no son compatibles con un tipo específico de sarcoma en pacientes de edad avanzada. Por lo general, el carcinoma y el mesotelioma sarcomatoide son positivos para citoqueratina, y se debe usar una antiqueratina de amplio espectro, como AE1/AE3, para su detección. No obstante, algunos sarcomas también pueden ser positivos para citoqueratina y, en consecuencia, se requieren marcadores más específicos para su diferenciación. Algunos carcinomas y mesoteliomas sarcomatoides son tan poco diferenciados que podrían no revelar, mediante una investigación inmunohistoquímica, ni siquiera un indicio de su derivación, y podrían llegar a ser indiferenciables de un sarcoma verdadero si se sacan de su contexto.

¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles en el diagnóstico de los llamados tumores malignos torácicos con deficiencia de *SMARCA4*?

Aunque el término propuesto originalmente, “sarcoma torácico deficiente en *SMARCA4*”, se ha usado ampliamente en la bibliografía (Le Loarer et al., 2015; Perret et al., 2019; Sauter et al., 2017; Yoshida et al., 2017), datos recientes sugieren una derivación epitelial en muchos de estos casos (Rekhtman et al., 2020), lo que plantea una controversia en cuanto a la terminología apropiada. En el año 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) utilizó el término “tumor no diferenciado torácico con deficiencia de *SMARCA4*” en su clasificación.

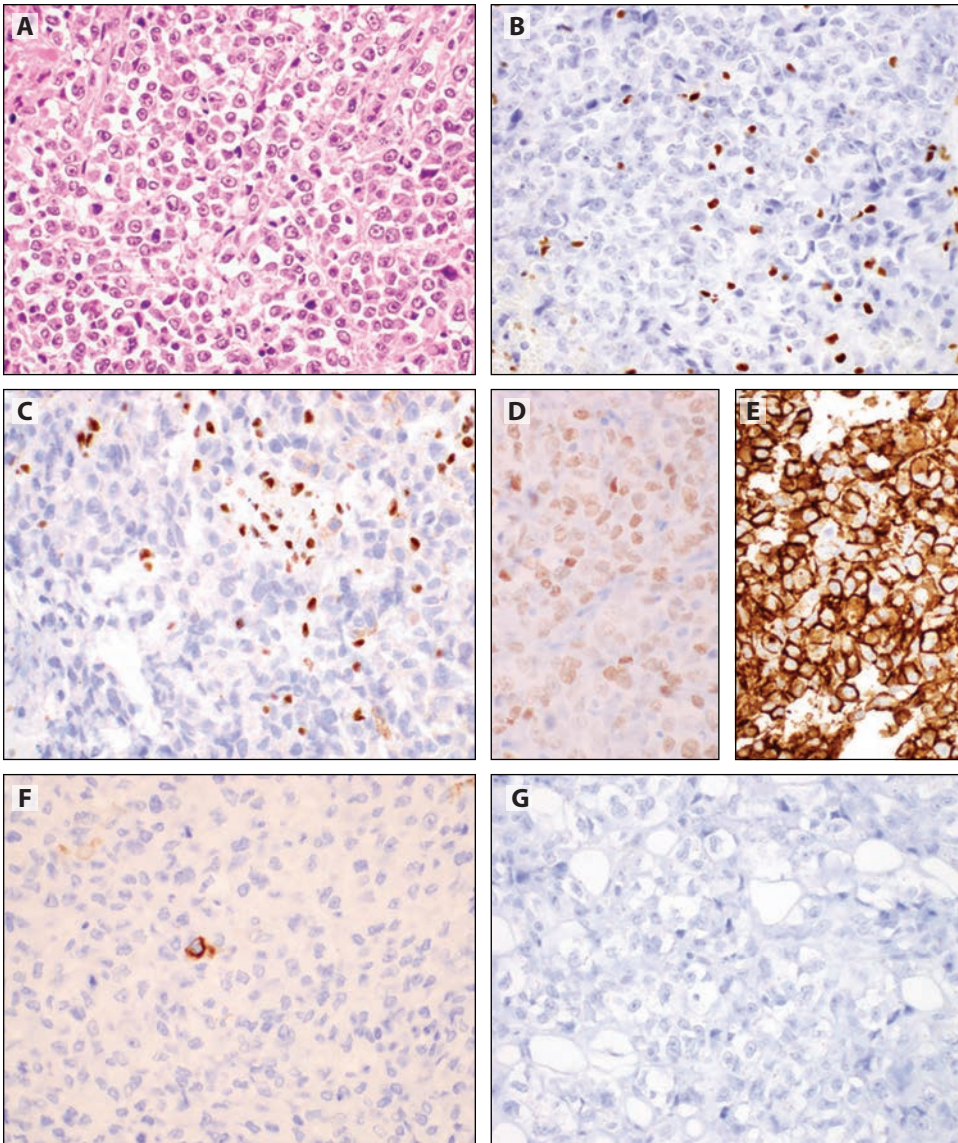


Figura 15-1. (A) Tumor no diferenciado torácico con deficiencia de *SMARCA4*. (B) Por lo general, la expresión de *SMARCA4* se pierde por completo en función de los controles positivos intactos como las células endoteliales o las células inflamatorias. (C) La tinción para *SMARCA2* (BRM) se pierde en la gran mayoría de los casos. Siempre se retiene la expresión de *SMARCB1* (inhibidor de integrasa 1 [INI1]). Muchos casos expresan (D) factor de transcripción tipo Spalt 4 (proteína tipo Sal 4 [SALL4]) y (E) CD34. (F) La citoqueratina debe ser focal o negativa y (G) la claudina 4 debe ser negativa.

La característica definitoria de esta entidad es la deficiencia de *SMARCA4* (BRG1), además de la histología clásica. Es común que la expresión de *SMARCA4* se pierda por completo en función de los controles positivos internos como las células endoteliales o las células inflamatorias (Perret et al., 2019; Sauter et al., 2017; Yoshida et al., 2017). Además, la tinción para *SMARCA2* (BRM) se pierde en la gran mayoría de los casos (Perret et al., 2019; Yoshida et al., 2017), pero siempre se retiene la expresión de *SMARCB1* (inhibidor de integrasa 1 [INI1]). Los casos pueden expresar un factor de transcripción tipo Spalt 4 (proteína tipo Sal 4 [SALL4]), CD34 o SOX2 (Perret et al., 2019; Yoshida et al., 2017), y la expresión de *SALL4* puede tener como resultado un diagnóstico erróneo de tumor de células germinales. Es común que la citoqueratina se

expresen a menudo de manera focal; una tinción sólida, fuerte y difusa de citoqueratina citoplasmática es muy inusual y debería indicar carcinoma o mesotelioma. La claudina 4 es negativa en la mayoría de los casos. Los casos excepcionales pueden expresar el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1). Ellos son uniformemente negativos para proteína nuclear en testículo (NUT), desmina, miogenina y S100. La pérdida de la expresión de SMARCA4 no es específica para los tumores no diferenciados torácicos con deficiencia de *SMARCA4*, debido a que se puede observar en carcinomas de diversos órganos, incluidos el carcinoma de pulmón, el carcinoma microcítico de ovario tipo hipercalcémico, además de un subgrupo de tumores teratoides rabdoideos atípicos del sistema nervioso central ([Figura 15-1A-G](#)).

En un subgrupo pequeño de casos, la tinción para SMARCA4 se puede reducir notablemente en comparación con las células de control, pero aún puede ser visible (Yoshida et al., 2017; Rekhtman et al., 2020), como se muestra en la [figura 15-2](#).

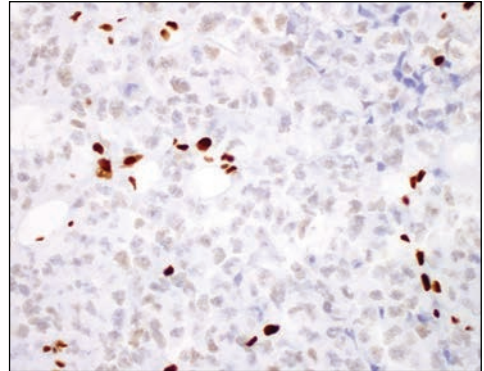


Figura 15-2. La tinción para SMARCA4 puede estar reducida, aunque visible, en comparación con el control interno.

Resumen de respuesta

El tumor maligno torácico con deficiencia de *SMARCA4* no diferenciado muestra una ausencia o disminución marcada de la inmunotinción para SMARCA4 (BRG1).

¿Cuándo se debe considerar la tinción para SMARCA4 en la evaluación de los tumores torácicos?

Un subgrupo menor de adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células grandes y carcinoma pleomórfico carece de inmunorreactividad para SMARCA4 (Matsubara et al., 2013; Oike et al., 2013; Yoshimoto et al., 2015). Dicho subgrupo de carcinoma tiende a mostrar una histología poco diferenciada y es común que sea negativo para TTF1. Estos tumores no cumplen los criterios histológicos de tumor torácico con deficiencia de *SMARCA4* no diferenciado, ya que carecen de una histología no diferenciada acorde con células redondas levemente discohesivas y relativamente monótonas con o sin elementos rabdoideos, que imitan a tumores rabdoideos malignos o a la variante proximal del sarcoma epitelioides ([figura 15-3](#)). Cuando existe una diferenciación epitelial clara, como la presencia de láminas cohesivas, formación de glándulas, estructura papilar o queratinización, la tinción para SMARCA4 no está indicada de forma rutinaria para el

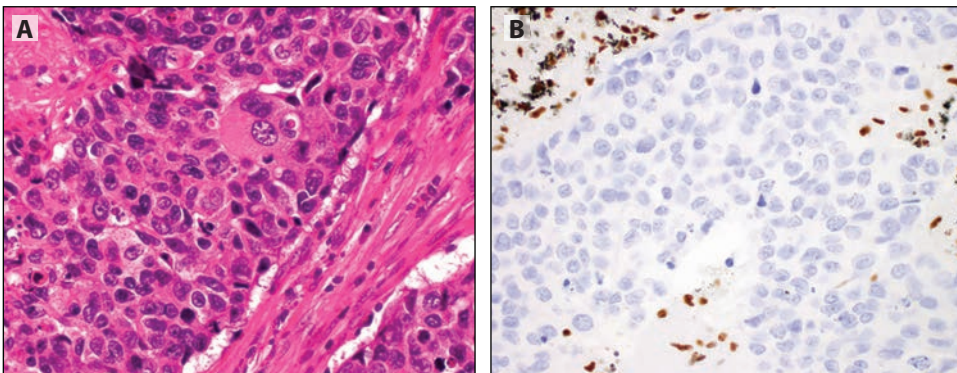


Figura 15-3. (A y B) Un caso inequívoco de carcinoma que muestra ausencia de tinción para SMARCA4.

diagnóstico. Un estudio reciente también identificó una pequeña cantidad de tumores compuestos, incluyendo un componente de carcinoma bien definido yuxtapuesto (Rekhtman et al., 2020).

Resumen de respuesta

La tinción para SMARCA4 se debe realizar en tumores morfológicamente no diferenciados, relativamente monótonos, discohesivos o con patrón rabdoide, y no de forma más general en carcinomas morfológicamente no diferenciados.

¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para demostrar la diferenciación endotelial vascular?

La combinación confiable de marcadores endoteliales vasculares es de ERG y CD31, la cual tiñe más del 95 % de las neoplasias endoteliales vasculares (Miettinen et al., 2011). La expresión nuclear de ERG en los tumores endoteliales suele ser difusa y fuerte, en contraste con su negatividad o, a lo sumo, débilmente expresada en algunos carcinomas. La expresión de CD31 usualmente es difusa y membranosa en las células endoteliales ([figura 15-4](#)). Otros marcadores endoteliales incluyen CD34, FLI1 y antígeno relacionado con factor VIII, pero su sensibilidad y especificidad no son suficientes y, por ende, no se recomiendan como marcadores definitivos de la diferenciación endotelial.

CD31 también se expresa en los macrófagos/histiocitos ([figura 15-5](#)). La expresión fuerte de CD31 de los histiocitos infiltrantes de tumores no se debe malinterpretar como reactividad

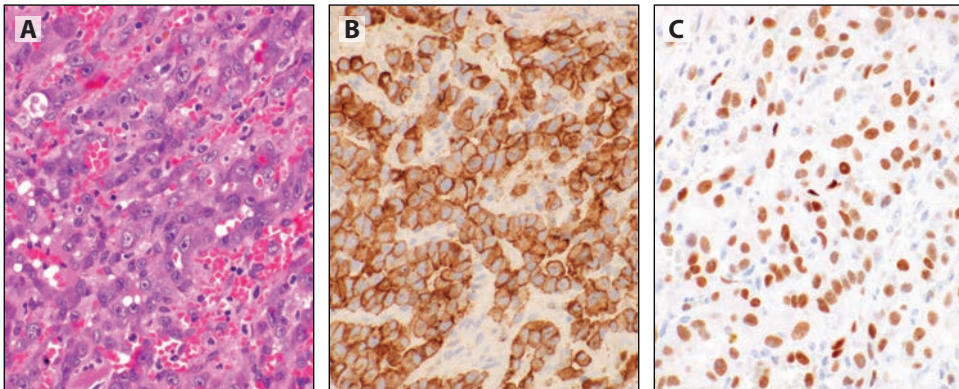


Figura 15-4. Un angiosarcoma epiteloide (A) con inmunohistoquímica para (B) CD31 con tinción membranosa difusa y (C) ERG con tinción nuclear fuerte.

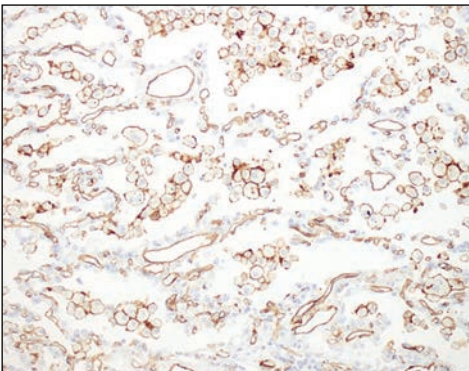


Figura 15-5. Inmunohistoquímica para CD31 en tejido pulmonar con tinción de macrófagos alveolares.

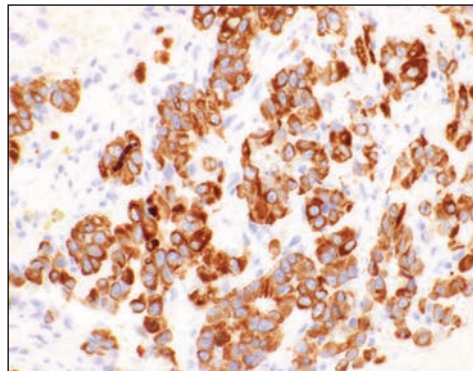


Figura 15-6. La inmunohistoquímica para citoqueratina es positiva en un angiosarcoma epiteloide.

tumoral y evidencia de diferenciación endotelial (McKenney et al., 2001). También se observa expresión de ERG en células hematolinfoides, células cartilaginosas, sarcoma epitelioides, un subgrupo de adenocarcinoma prostático y el sarcoma de Ewing.

La expresión de citoqueratinas es relativamente común en las neoplasias endoteliales vasculares epitelioides y no se debe tomar como evidencia de diferenciación epitelial (figura 15-6).

Resumen de respuesta

El ERG y el CD31 son marcadores endoteliales útiles. Otros marcadores, como el CD34 y el FLI1, son potencialmente útiles pero menos definitivos.

¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles en la subtipificación de los tumores endoteliales vasculares malignos?

Los angiosarcomas y los hemangioendoteliomas epitelioides (EHE) son dos neoplasias malignas endoteliales vasculares que se pueden presentar en el pulmón y la pleura. A menudo, la morfología permite la diferenciación entre estas dos entidades. Además de los marcadores endoteliales encontrados en estos dos tumores, no hay otros marcadores específicos para el angiosarcoma.

Más del 95 % de los EHE albergan la fusión *WWTR1-CAMTA1* y, como resultado, la IHQ para el activador de transcripción de unión a calmodulina 1 (CAMTA1) se expresa de forma difusa en el núcleo de las células neoplásicas (Shibuya et al., 2015; Doyle et al., 2016) (figura 15-7).

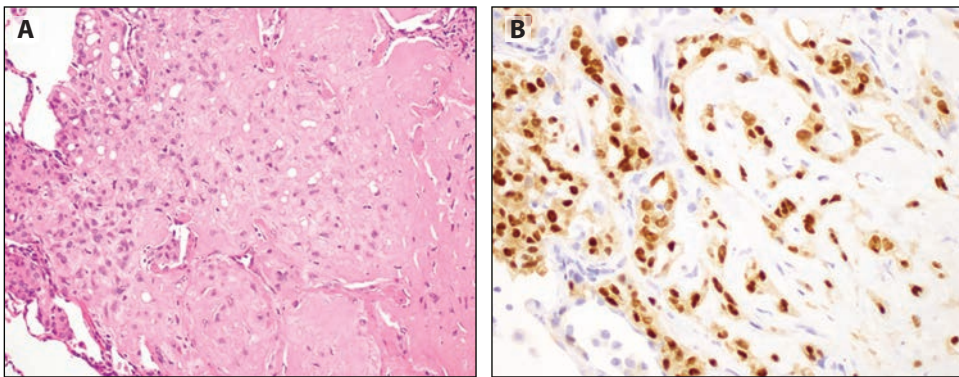


Figura 15-7. (A) Un hemangioendotelioma epitelioides (EHE) que muestra **(B)** expresión nuclear fuerte de activador 1 de transcripción de unión a calmodulina (CAMTA1).

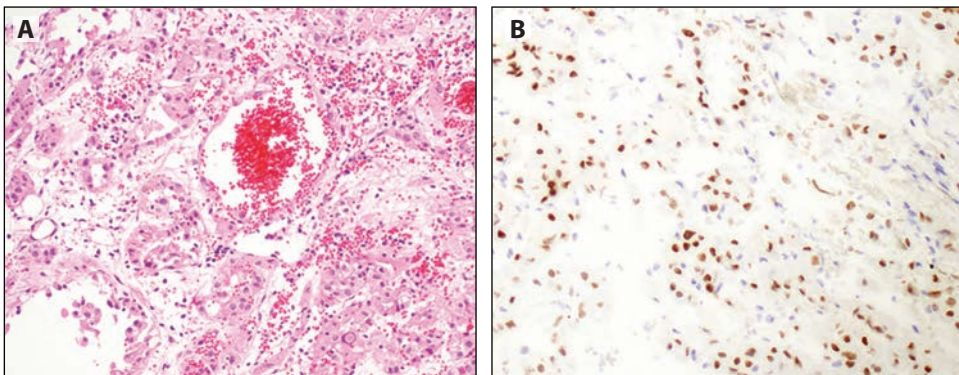


Figura 15-8. (A) Hemangioendotelioma epitelioides (EHE) con reordenamiento *TFE3* que muestra **(B)** reactividad nuclear del factor de transcripción E3 (TFE3).

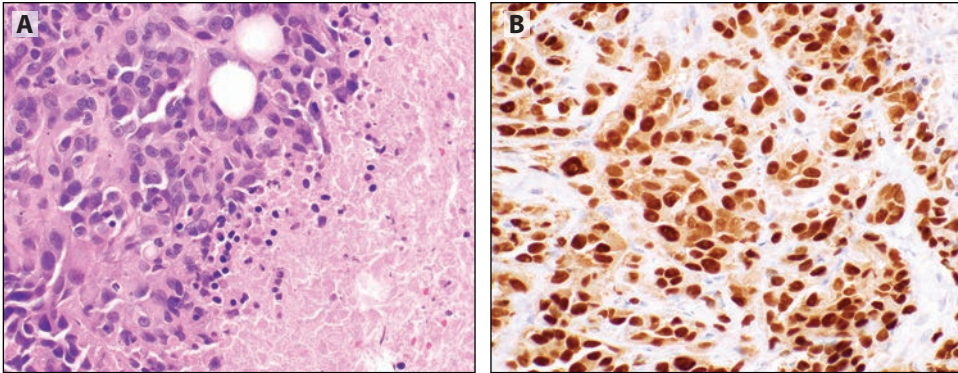


Figura 15-9. (A) Este hemangioendotelio epitelioide (EHE) con morfología agresiva mostró (B) una tinción positiva para el activador 1 de la transcripción de unión a calmodulina (CAMTA1). Esto confirma el diagnóstico.

El casi 5 % restante de los EHE alberga la fusión *YAPI-TFE3* y, por lo tanto, son positivos de manera difusa para la reactividad al factor de transcripción nuclear E3 (TFE3) ([figura 15-8](#)) (Antonescu et al., 2013).

Algunos EHE muestran una histología agresiva, y su reactividad para CAMTA1, la cual falta en el angiosarcoma epitelioide, ayuda a resolver el diagnóstico diferencial ([figura 15-9](#)).

Resumen de respuesta

La IHQ para CAMTA1 y TFE3 es un sustituto de la translocación y puede ser útil en la subclasificación de los tumores vasculares.

¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para diferenciar el sarcoma sinovial de sus imitadores?

Los sarcomas sinoviales son positivos para citoqueratina y/o antígeno de membrana epitelial (EMA) en el 80 % al 90 % de los casos, y la tinción para EMA a menudo es más diseminada que la de la citoqueratina (Pelms et al., 2002) ([figura 15-10](#)). Por el contrario, muchos otros tumores con histología sarcomatoide (por ejemplo, carcinomas sarcomatoides) pueden expresar EMA y citoqueratina; por ende, es imperativo no confiar de manera excesiva en estos marcadores para el diagnóstico de sarcoma sinovial. En contraste con los tumores fibrosos solitarios, es usual que los sarcomas sinoviales sean negativos para CD34 (Pelms et al., 2002) y carezcan de tinción para transductor de señal y activador de transcripción 6 (STAT6). P40 ayuda a diferenciar entre el sarcoma sinovial y un timoma tipo A. En el 90 % de los sarcomas sinoviales se observa expresión nuclear moderada a fuerte de la proteína 1 potenciadora similar a la transducina (TLE1) ([figura 15-10C](#)); sin embargo, esta no es completamente específica (Terry et al., 2007; Kosemehmetoglu et al., 2009; Foo et al., 2011). En el 90 % de los casos se observa una expresión reducida de SMARCB1 (INI1) en comparación con la intensidad intacta de las células endoteliales y las células inflamatorias de fondo, lo que se considera específico del carcinoma sinovial entre los tumores de células fusiformes (Ito et al., 2016; Arnold et al., 2013) ([figura 15-10D](#)).

Muchos sarcomas sinoviales expresan CD56 (Hartel et al., 2007) con una minoría de casos positivos para sinaptofisina (Sato et al., 2015), el cual es un fenotipo que puede representar un obstáculo y podría conducir a un diagnóstico erróneo como carcinoma neuroendocrino, en especial en biopsias pequeñas ([figura 15-11](#)).

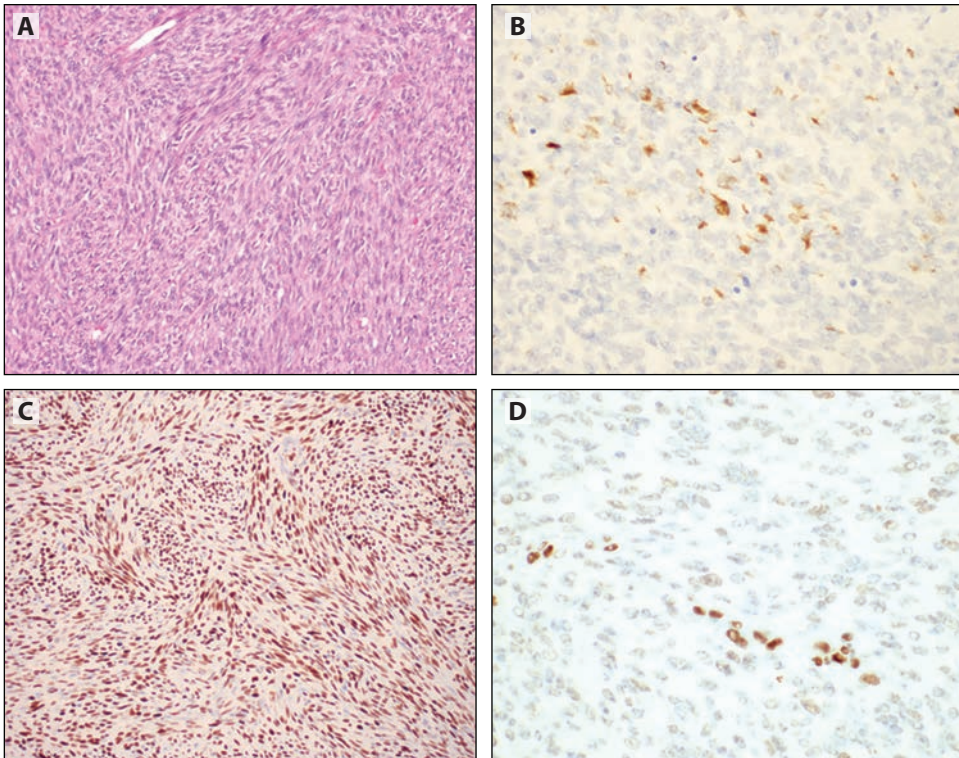


Figura 15-10. Inmunohistoquímica del sarcoma sinovial. El sarcoma sinovial monofásico en (A) es focalmente positivo para (B) citoqueratina, pero muestra (C) expresión nuclear difusa de activador 1 potenciador similar a la transducina (TLE1). La reducción en SMARCB1 (inhibidor de integrasa 1 [INI1]) es un patrón de tinción conocido, en comparación con las células endoteliales, mostradas en (D).

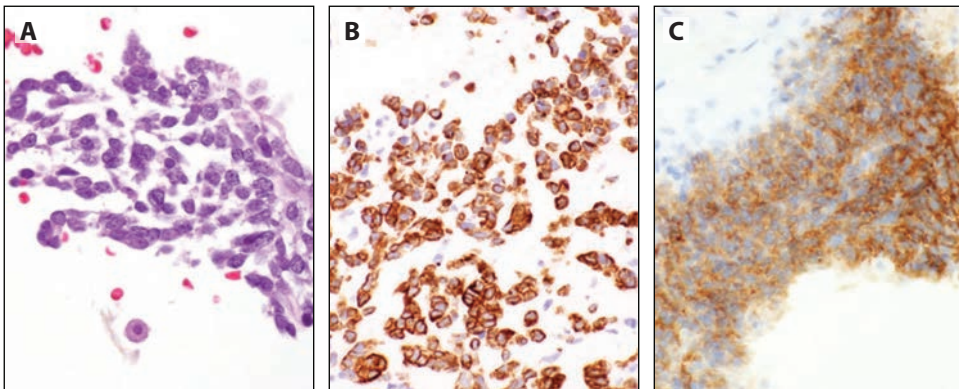


Figura 15-11. (A) Sarcoma sinovial con morfología microcística, en donde (B) la positividad para queratina y (C) sinaptofisina en dichos casos puede imitar a un carcinoma microcístico.

Resumen de respuesta

La IHQ para la citoqueratina y la TLE1, con negativos relevantes, puede ser útil en el diagnóstico del sarcoma sinovial. Sin embargo, los casos difíciles se pueden confirmar con hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o pruebas moleculares.

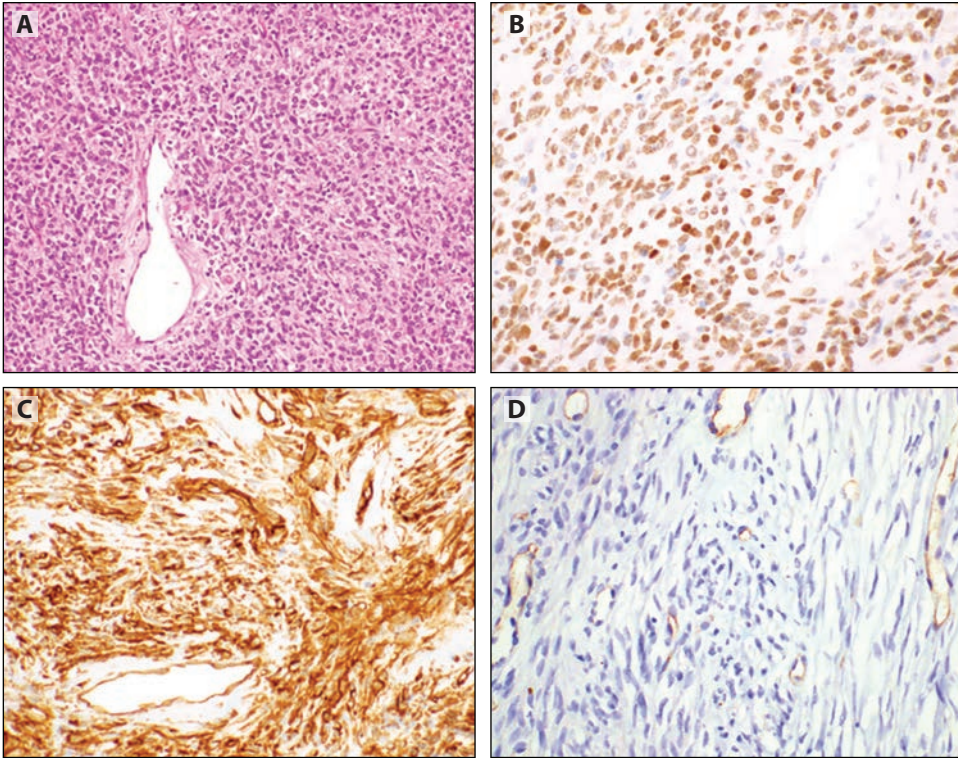


Figura 15-12. (A) Tumor fibroso solitario con (B) transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6) y (C) CD34 positivo. Sin embargo, CD34 es negativo (D) en algunos casos, especialmente en tumores malignos.

¿Qué marcadores inmunitarios son útiles para evaluar los tumores fibrosos solitarios?

Prácticamente todos los tumores fibrosos solitarios (SFT) albergan la fusión específica *NAB2-STAT6*. Esta fusión lleva a la acumulación anormal de la proteína STAT6 en el núcleo, la cual se detecta con facilidad como una inmunotinción nuclear fuerte para STAT6 ([figura 15-12A](#) y [B](#)). La reactividad se observa en un amplio espectro histológico de SFT y se acepta como un marcador altamente sensible y específico para ese diagnóstico (Doyle et al., 2014b; Yoshida et al., 2014). CD34 es positivo en más del 90 % de los SFT, pero la tinción puede ser focal o incluso estar ausente, en particular en SFT malignos. Aunque bcl-2 a menudo es positivo, este marcador no es específico ([figura 15-12C](#) y [D](#)).

El rendimiento de la IHQ para STAT6 puede estar influenciado considerablemente por la fijación. Por ejemplo, las muestras grandes de resección muchas veces exhiben reactividad solo en la periferia, con el centro negativo ([figura 15-13A](#)), lo que requiere de una búsqueda cuidadosa de áreas positivas (Yoshida et al., 2014).

Aunque el anticuerpo monoclonal para STAT6 casi siempre permite una interpretación inequívoca (Cheah et al., 2014), un anticuerpo policlonal para STAT6 a veces produce una reacción borrosa tanto en el citoplasma como en los núcleos en los tumores no SFT, la cual se debería interpretar con precaución ([figura 15-13B](#)). Un pequeño subgrupo (~10 %) de liposarcomas desdiferenciados muestra inmunorreactividad para STAT6 debido a la amplificación del gen *STAT6* (Doyle et al., 2014a) ([figura 15-13C](#)).

Resumen de respuesta

STAT6, mediante un anticuerpo monoclonal, es un marcador sensible y relativamente específico para los SFT.

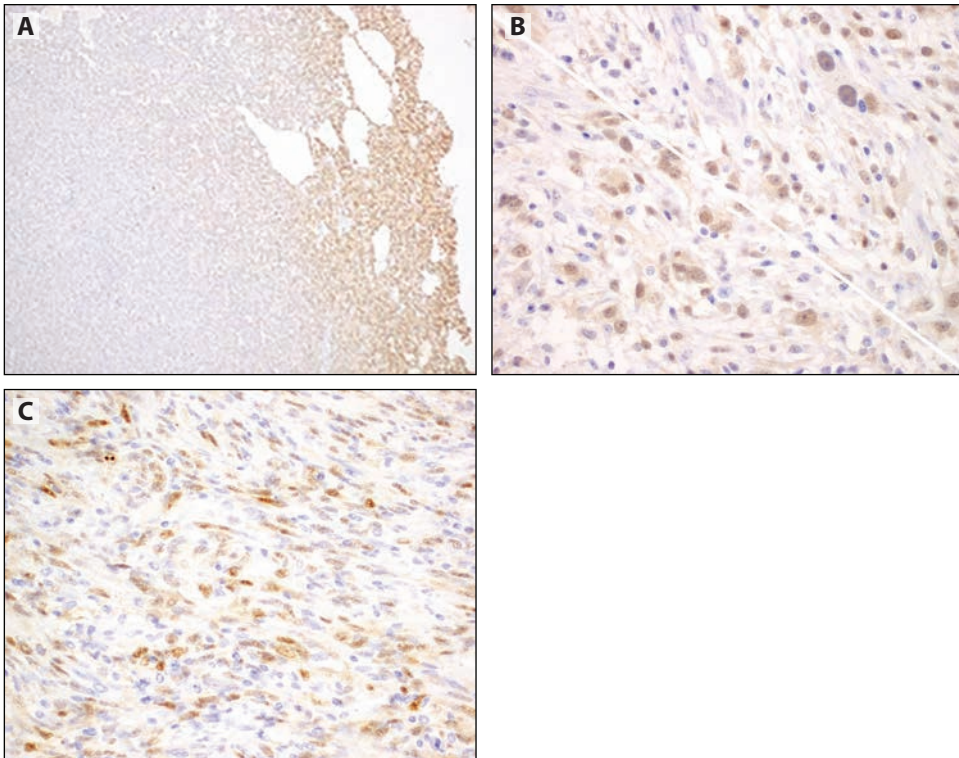


Figura 15-13. Dificultades en la inmunohistoquímica relacionadas con el transductor de señal y el activador de la transcripción 6 (STAT6). **(A)** La fijación puede producir un patrón de tinción periférico en el tejido tumoral. **(B)** Sarcoma pleomórfico indiferenciado que muestra reactividad citoplasmática/nuclear para STAT6 con un reactivo policlonal, el cual no se debe interpretar como un diagnóstico positivo con respecto al tumor fibroso solitario (SFT). **(C)** Liposarcoma desdiferenciado con tinción multifocal para STAT6 con distribución citoplasmática y nuclear.

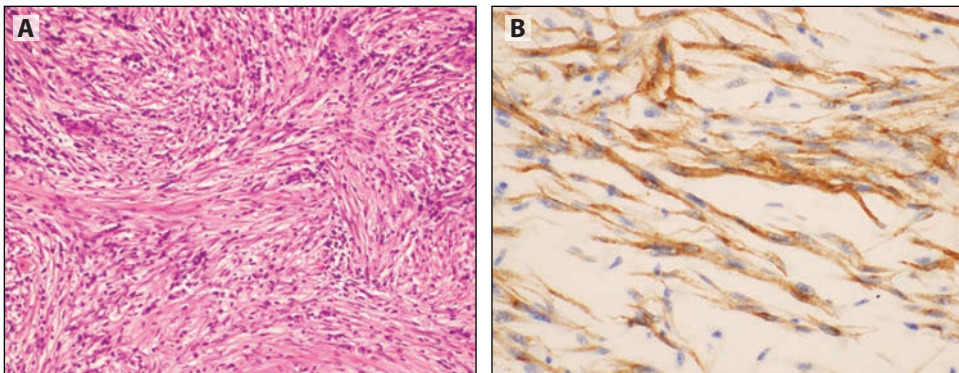


Figura 15-14. **(A)** Los tumores miofibroblásticos inflamatorios son **(B)** inmunopositivos para quinasa de linfoma anaplásico (ALK). Esto se observa en casos positivos para translocación *ALK* (del 60 % al 70 %).

¿Son útiles los marcadores inmunitarios para diagnosticar los tumores miofibroblásticos inflamatorios?

Aproximadamente entre el 60 % y el 70 % de los tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI) albergan fusiones *ALK* con varios genes complementarios diferentes ([figura 15-14](#)). Algunas fusiones (como *PPFIBP1-ALK*) expresan un nivel bajo de proteína quinasa del linfoma anaplásico (ALK) y, por lo tanto, se recomienda un clon de ALK altamente sensible para lograr una detección óptima, tales como D5F3, 1A4, o 5A4 (Takeuchi et al., 2011). La expresión de ALK

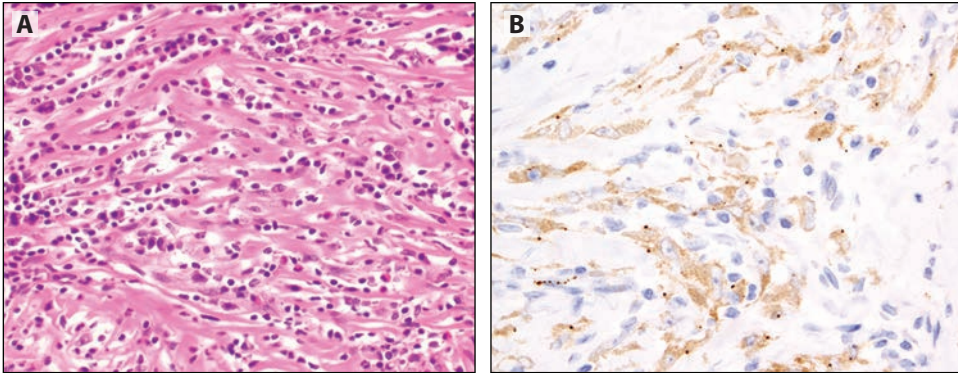


Figura 15-15. (A) Este tumor miofibroblástico inflamatorio (TMI) con translocación de proteína del oncogén 1 c-ros **(B)** (ROS1) muestra inmunorreactividad para ROS1.

no es específica para los TMI en el contexto de un tumor de células fusiformes en el pulmón. Además de la diferenciación sarcomatoide del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) con reordenamiento *ALK* (Mason et al., 2016), otros tumores como el rhabdomyosarcoma y el histiocitoma fibroso angiomatoide pueden expresar *ALK* a pesar de la falta de un gen de fusión (Cheah et al., 2019; Yoshida et al., 2013). Los TMI expresan actina de músculo liso (SMA) y/o desmina en grados variables, las cuales reflejan la diferenciación miofibroblástica. La coexpresión de SMA y de desmina no indica necesariamente una diferenciación de músculo liso. Los TMI pueden ser positivos para citoqueratina, pero esto se debe tener en cuenta para evitar llegar a un diagnóstico erróneo de tumores epiteliales (Coffin et al., 1995).

Un pequeño subgrupo de TMI *ALK*-negativos albergan reordenamientos alternativos de oncogén 1 c-ros (*ROS1*) o de receptor de tirosina quinasa neurotrópico (*NTRK*), y estos subgrupos son detectables mediante IHQ para *ROS1* (figura 15-15) y pan-*TRK*, respectivamente (Hornick et al., 2015; Yamamoto et al., 2019).

Resumen de respuesta

En el entorno morfológico correcto, la IHQ para *ALK* o *ROS1* puede ser útil en el diagnóstico de TMI.

¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para evaluar los sarcomas pleomórficos de células fusiformes?

Prácticamente todos los liposarcomas desdiferenciados albergan una amplificación de alto nivel del gen *MDM2*, con coamplificación de *CDK4* en el 80 % de los casos. Esto lo refleja la coexpresión inmunohistoquímica de homólogo de ratón doble minuto 2/proteína ubiquitina-ligasa E3 (*MDM2*) y quinasa 4 dependiente de ciclina (*CDK4*) en más del 90 % de los casos (figura 15-16) (Binh et al., 2005). La expresión de *MDM2* o *CDK4* por sí sola no es específica para amplificación genética, y la reactividad para *MDM2* en sí misma se puede observar en el 20 % de otros tipos de sarcoma (Binh et al., 2005). Además, los carcinomas o mesoteliomas sarcomatoides pueden mostrar sobreexpresión de *MDM2* y, por ende, es necesaria la correlación con morfología y otros marcadores.

Aproximadamente el 70 % de los sarcomas relativos a la íntima (incluyendo el sarcoma de la íntima cardiaca [Neuville et al., 2014]) albergan la amplificación del *MDM2* y, como resultado, la inmunotinción para *MDM2* es positiva (Bode-Lesniewska et al., 2001) (figura 15-17). Sin embargo, la falta de amplificación de *MDM2* o de sobreexpresión de *MDM2* no excluye el diagnóstico. Es común que el sarcoma relativo a la íntima muestre una histología de sarcoma

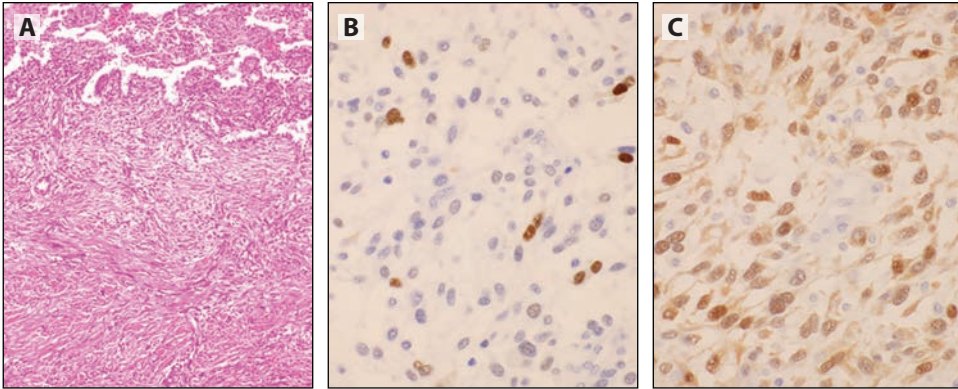


Figura 15-16. (A) Liposarcoma dediferenciado que compromete al pulmón y muestra (B) inmunorreactividad para MDM2 y (C) CDK4.

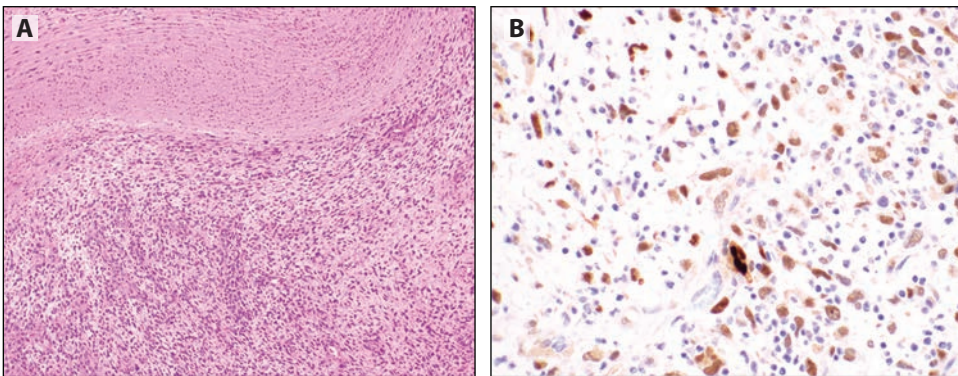


Figura 15-17. (A) Sarcoma relacionado con la íntima de la arteria pulmonar, con la media arterial ubicada a nivel superior en esta imagen, el cual es (B) positivo para MDM2 nuclear.

pleomórfico indiferenciado; a pesar de ello, un subgrupo de casos muestra diferenciación heteróloga, tanto morfológica como inmunofenotípicamente.

Los leiomiomas muestran diferenciación de músculo liso, ejemplificada por la reactividad a SMA, desmina y h-caldesmona. Al menos dos de estos marcadores son positivos, además de la histología clásica en la mayoría de los casos, y la h-caldesmona es el marcador más específico de ellos ([figura 15-18](#)).

Solo la mitad de los tumores malignos de la vaina de nervio periférico (MPNST) muestra inmunorreactividad a la proteína S100 y/o SOX10, y la tinción muchas veces es débil y focal. Por ende, la tinción fuerte y difusa para S100 o SOX10 indica un diagnóstico alterno, como un schwannoma celular o un melanoma maligno sarcomatoide. Los MPNST a menudo albergan alteraciones inactivadoras de los genes que codifican SUZ12 o EED, componentes clave del complejo represivo Polycomb 2 y, consecuentemente, se pierde la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27. Este fenómeno se visualiza como la pérdida de expresión de H3K27me3 ([figura 15-19](#)), que se observa en aproximadamente del 50 % al 60 % de los MPNST, a diferencia de sus imitadores, como el sarcoma sinovial que retiene H3K27me3 (Schaefer et al., 2016; Asano et al., 2017; Prieto-Granada et al., 2016).

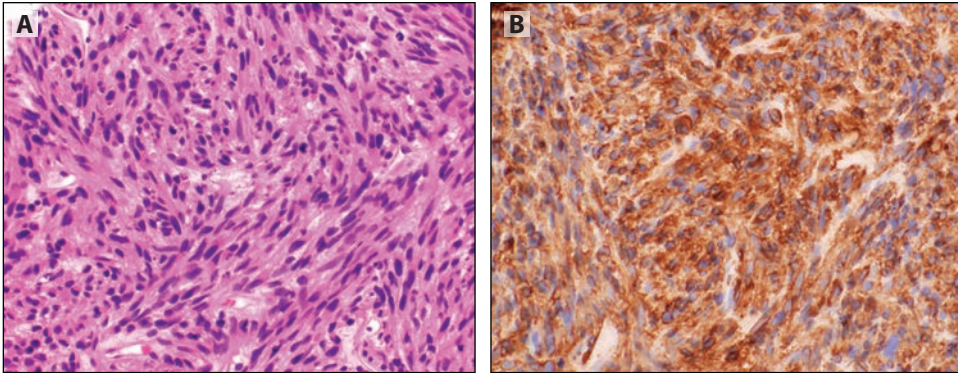


Figura 15-18. (A) Leiomiomasarcoma **(B)** positivo para h-caldesmona.

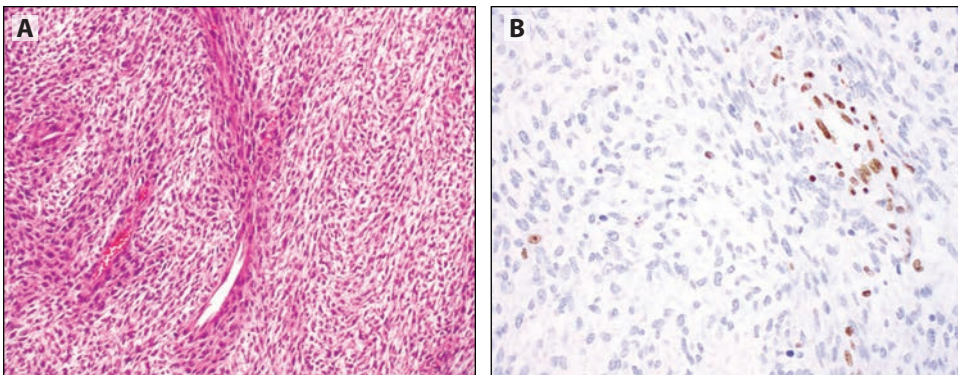


Figura 15-19. (A) Tumores malignos de vaina de nervio periférico (MPNST) con **(B)** pérdida nuclear de H3K27me3.

Resumen de respuesta

Existen diversos marcadores que pueden ayudar a clasificar el sarcoma de células fusiformes como MDM2, los marcadores musculares y el H3K27me3, pero todos ellos pueden tener reactividad en más de un tipo de tumor.

¿Cuáles marcadores inmunitarios son útiles para evaluar el sarcoma de células redondas?

La mayoría de los sarcomas de Ewing muestran expresión de CD99. Aunque la positividad para CD99 en sí misma se puede observar en muchos tumores, la tinción membranosa fuerte y difusa para CD99 aún puede ser un hallazgo útil que impulse un análisis más profundo para el sarcoma de Ewing. Estos tumores también pueden expresar CD56, sinaptofisina y/o proteína 1 asociada al insulinooma (INSM1), y son positivos para citoqueratina en alrededor del 20 % de los casos, lo que hace todavía más difícil la distinción del carcinoma microcítico. Los marcadores más específicos para el sarcoma de Ewing incluyen NKX2-2 y PAX7 (Toki et al., 2018) ([figura 15-20](#)).

Sin embargo, NKX2-2 puede ser positivo en una proporción de carcinomas microcíticos y tumores neuroendocrinos de origen pancreático y del tracto gastrointestinal, y se debe usar con precaución a la luz del contexto histológico y clínico (Hung y et al., 2016; Yoshida et al., 2012) ([figura 15-21](#)).

Los sarcomas con reordenamiento *CIC* muestran expresión nuclear de tumor de Wilms 1 (WT1) y de factor de transcripción 4 de la variante ETS (ETV4) entre el 80 % y el 90 % de los casos, a diferencia del sarcoma de Ewing (Yoshida et al., 2016; Hung et al., 2016). En

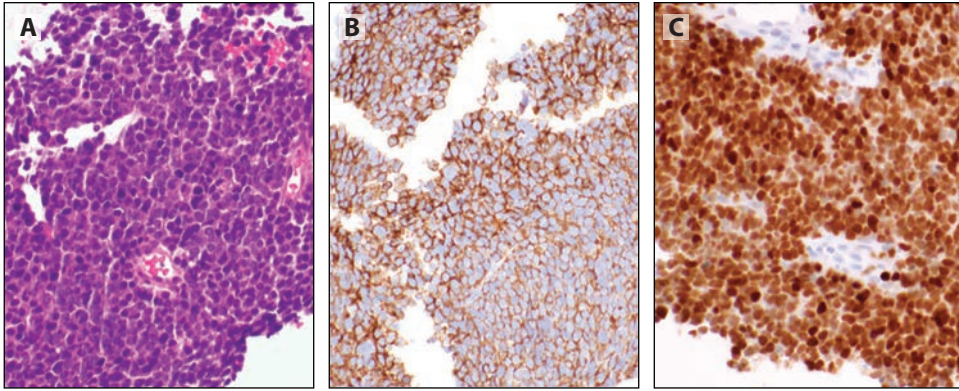


Figura 15-20. (A) Sarcoma de Ewing con (B) expresión membranosa fuerte de CD99 y (C) nuclear de NKX2-2.

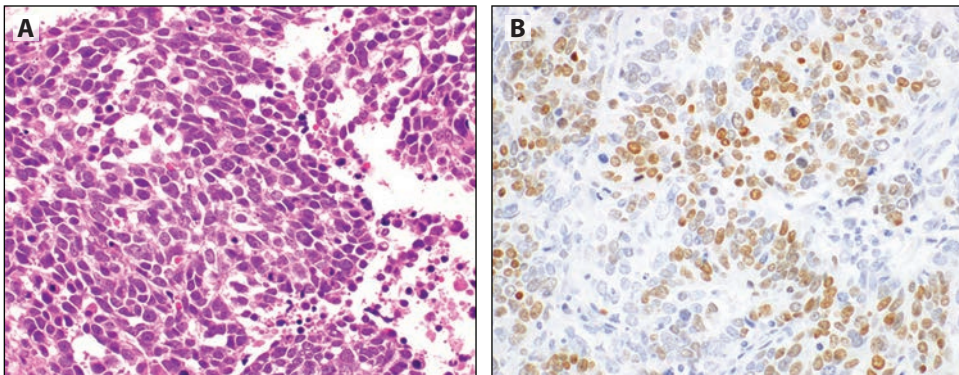


Figura 15-21. (A) Carcinoma microcítico (B) positivo para NKX2-2, que podría dar como resultado un posible diagnóstico erróneo para sarcoma de Ewing.

ocasiones, los sarcomas con reordenamiento *CIC* muestran morfología epiteliode junto con expresión de citoqueratina dispersa, y en muchos casos expresan calretinina además de WT1, lo que implica la posibilidad de diagnósticos erróneos de mesotelioma (Yoshida et al., 2016) ([figura 15-22](#)).

Es poco común que se presenten tumores desmoplásicos de células redondas y pequeñas en la pleura. Este tipo de tumores muestra coexpresión de citoqueratina y desmina. Además, se caracterizan por la expresión nuclear de WT1 solo cuando se usa el anticuerpo WT1 (C-terminal), mientras que la tinción para WT1 (N-terminal) es negativa (Barnoud et al., 2000) ([figura 15-23](#)).

También es poco común que los rhabdomyosarcomas afecten de manera primaria a la cavidad torácica. Por lo general, el rhabdomyosarcoma es positivo para miogenina y/o MYOD1, además de desmina ([figura 15-24](#)).

El rhabdomyosarcoma alveolar puede ser positivo para citoqueratina ([figura 15-25A](#)), CD56 ([figura 15-25B](#)) y sinaptofisina ([figura 15-25C](#)), lo que podría tener como resultado un diagnóstico erróneo de carcinoma microcítico (Bahrami et al., 2008; Wallace et al., 2019).

Resumen de respuesta

Los marcadores del sarcoma de células redondas pueden ser útiles para el diagnóstico, pero existe cierta superposición con entidades más comunes como el carcinoma microcítico. Las consideraciones epidemiológicas (la edad) y la localización del tumor pueden ser útiles, así como el FISH y las pruebas moleculares, según sea necesario.

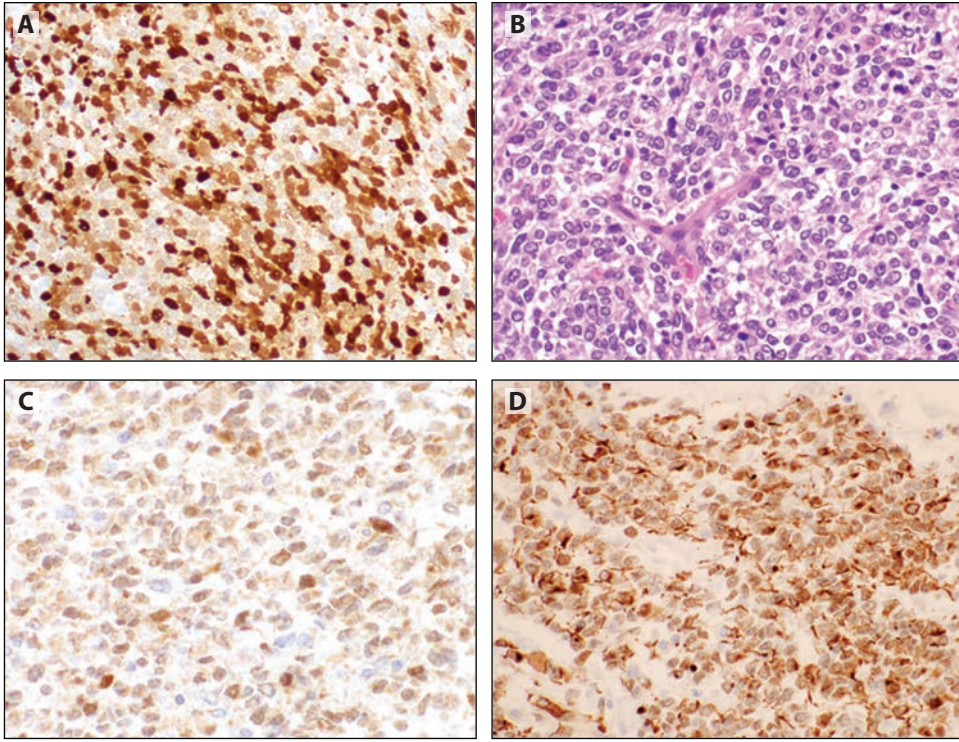


Figura 15-22. (A) Sarcoma con reordenamiento *CIC* con expresión membranosa de (B) variante 4 de translocación ETS (*ETV4*), (C) expresión nuclear de tumor de Wilms 1 (*WT1*) y (D) expresión positiva de calretinina.

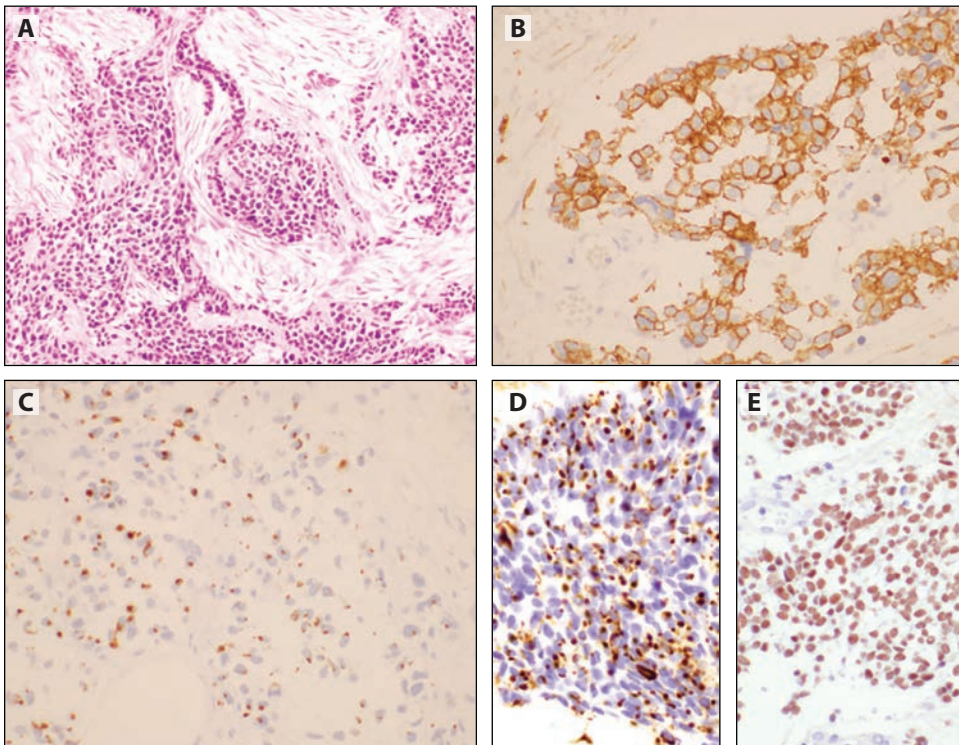


Figura 15-23. (A) Tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas, (B) positivos para citoqueratina AE1/AE3, (C) desmina, (D) tumor de Wilms 1 (*WT1*) N-terminal que solo muestran reactividad citoplasmática con tinción nuclear negativa, (E) *WT1* C-terminal con tinción nuclear positiva.

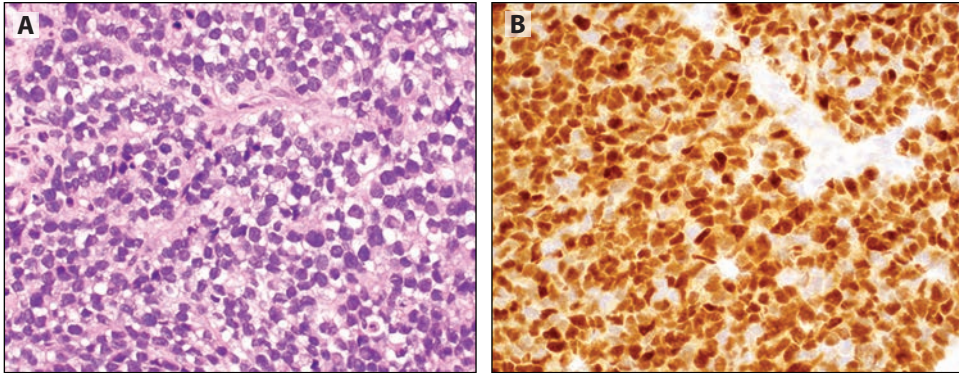


Figura 15-24. (A) Rbdomiosarcoma alveolar, (B) positivo para miogenina.

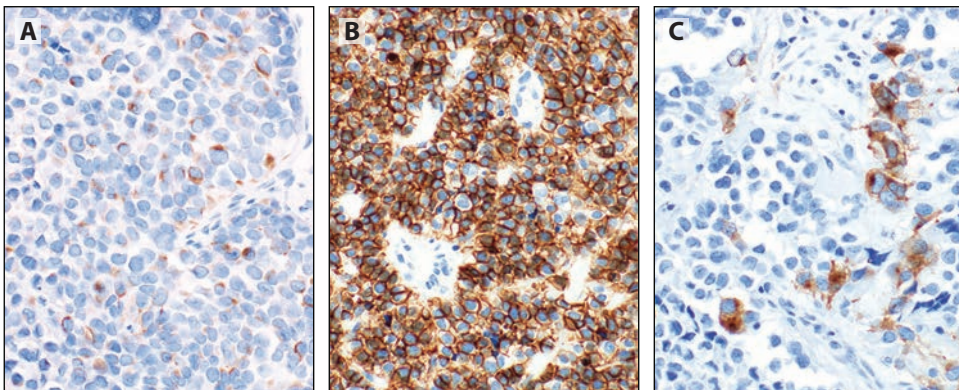


Figura 15-25. (A) Rbdomiosarcoma alveolar, positivo para citoqueratina, (B) CD56 y (C) sinaptofisina.

¿Cuáles marcadores inmunitarios ayudan a diferenciar el PEComa de sus imitadores?

Los PEComas (los sinónimos para los tumores perivasculares de células epitelioides, que son los tumores de células claras o *sugar tumors*) usualmente expresan marcadores melanocíticos, incluyendo HMB45 (patrón de tinción citoplasmática granular focal), melan A, tirosinasa A, CD68 (clon KP1) y catepsina K; y un subgrupo expresa S100 y/o factor de transcripción asociado con microftalmia (MiTF). En general, estos tumores son negativos para queratina y para TTF1. Estas tinciones ayudan a diferenciar este tumor de los carcinomas que pueden mostrar características de células claras, como el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma de tipo sólido o el carcinoma metastásico de células renales claras. En contraste con los PEComas, las células de la lesión en la linfangioleiomiomatosis expresan SMA de manera más extensa y en ocasiones desmina, y son negativas para S100 (Calio et al., 2018; Thway y Fisher, 2015; Lantuejoul et al., 1997) ([figura 15-26](#)).

Resumen de respuesta

Los PEComas suelen ser negativos para la citoqueratina y positivos para el HMB45, el melan A y la tirosinasa A.

Conclusiones

Aunque los tumores mesenquimales torácicos primarios y los sarcomas son poco comunes, pueden imitar a muchos otros tumores en el pulmón y el mediastino; por ende, es necesario que sean considerados en el análisis de otras neoplasias. Además, es frecuente que los

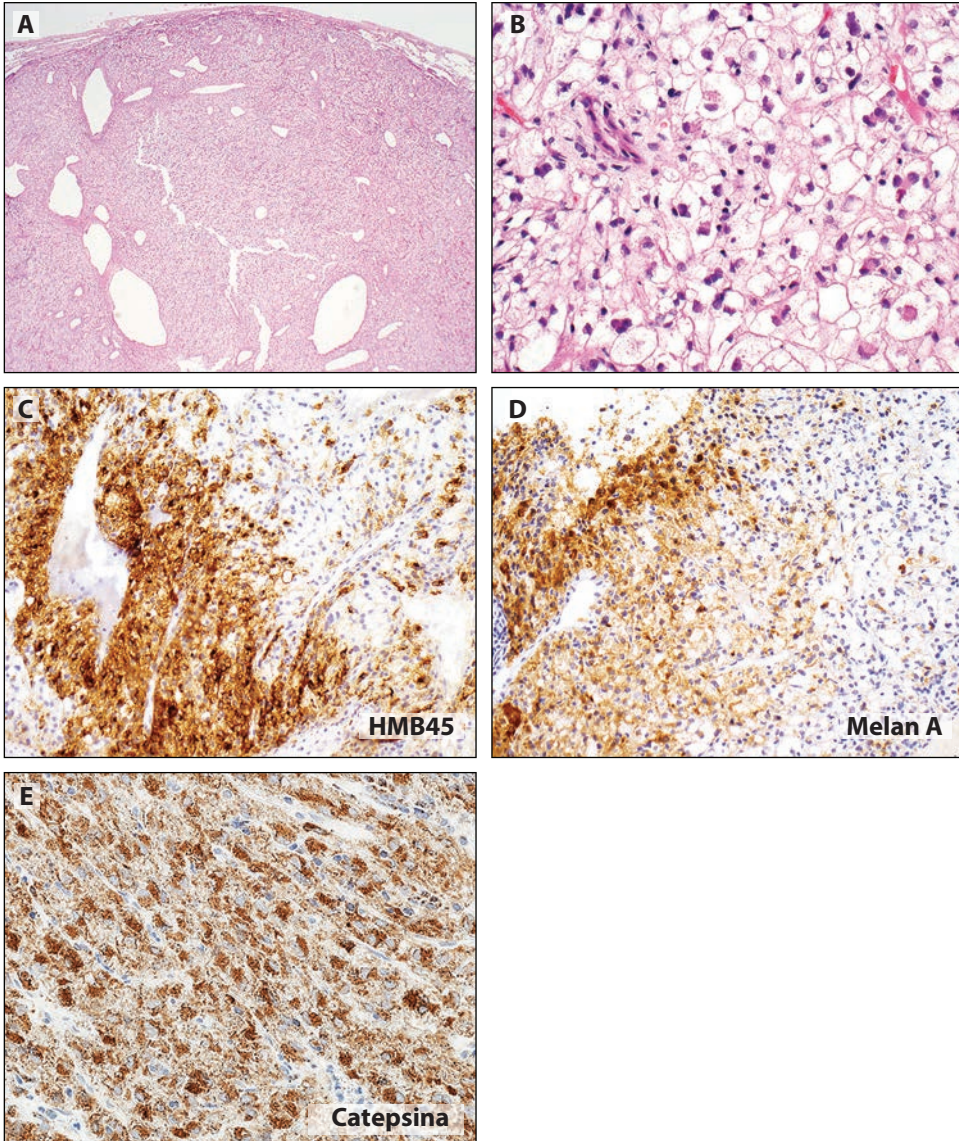


Figura 15-26. (A) Con poco aumento, este PEComa está circunscrito; y (B) con más aumento, muestra células claras. (C) La inmunohistoquímica (IHQ) para HMB45, (D) melan A, y (E) catepsina K es positiva. (E) cortesía del Dr. H. Ninomiya, División de Patología, The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokio, Japón)

sarcomas hagan metástasis en el tórax, a veces muchos años después que se ha tratado el tumor primario. La IHQ puede ser valiosa en la diferenciación de muchos de estos tumores, y usualmente se debe aplicar un panel de inmunotinciones, puesto que la mayoría de los marcadores son inespecíficos para una entidad tumoral aislada. Además, en algunos tumores, aunque la IHQ puede ayudar en el análisis diagnóstico, en ocasiones el diagnóstico final puede requerir de estudios moleculares (por ejemplo, sarcomas sinoviales o sarcomas de Ewing).

Referencias

Antonescu CR, Le Loarer F, Mosquera JM, et al. Novel YAP1-TFE3 fusion defines a distinct subset of epithelioid hemangioendothelioma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(8):775-784.

Arnold MA, Arnold CA, Li G, et al. A unique pattern of INI1 immunohistochemistry distinguishes synovial sarcoma from its histologic mimics. *Hum Pathol*. 2013;44(5):881-887.

- Asano N, Yoshida A, Ichikawa H, et al. Immunohistochemistry for trimethylated H3K27 in the diagnosis of malignant peripheral nerve sheath tumours. *Histopathology*. 2017;70(3):385-393.
- Bahrami A, Gown AM, Baird GS, et al. Aberrant expression of epithelial and neuroendocrine markers in alveolar rhabdomyosarcoma: a potentially serious diagnostic pitfall. *Mod Pathol*. 2008;21(7):795-806.
- Barnoud R, Sabourin JC, Pasquier D, et al. Immunohistochemical expression of WT1 by desmoplastic small cell tumor: a comparative study with other small round cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(6):830-836.
- Binh MB, Sastre-Garau X, Guillou L, et al. MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(10):1340-1347.
- Bode-Lesniewska B, Zhao J, Speel EJ, et al. Gains of 12q13-14 and overexpression of mdm2 are frequent findings in intimal sarcomas of the pulmonary artery. *Virchows Arch*. 2001;438(1):57-65.
- Calio A, Mengoli MC, Cavazza A, et al. Cathepsin K expression in clear cell "sugar" tumor (PEComa) of the lung. *Virchows Arch*. 2018;473(1):55-59.
- Cheah AL, Billings SD, Goldblum JR, et al. STAT6 rabbit monoclonal antibody is a robust diagnostic tool for the distinction of solitary fibrous tumour from its mimics. *Pathology*. 2014;46(5):389-395.
- Cheah AL, Zou Y, Lanigan C, et al. ALK expression in angiomatoid fibrous histiocytoma: a potential diagnostic pitfall. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(1):93-101.
- Coffin CM, Watterson J, Priest JR, et al. Extrapulmonary inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory pseudotumor). A clinicopathologic and immunohistochemical study of 84 cases. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(8):859-872.
- Doyle LA, Fletcher CD, Hornick JL. Nuclear expression of CAMTA1 distinguishes epithelioid heman-gioendothelioma from histologic mimics. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(1):94-102.
- Doyle LA, Tao D, Marino-Enriquez A. STAT6 is amplified in a subset of dedifferentiated liposarcoma. *Mod Pathol*. 2014;27(9):1231-1237. (a)
- Doyle LA, Vivero M, Fletcher CD, et al. Nuclear expression of STAT6 distinguishes solitary fibrous tumor from histologic mimics. *Mod Pathol*. 2014;27(3):390-395. (b)
- Foo WC, Cruise MW, Wick MR, et al. Immunohistochemical staining for TLE1 distinguishes synovial sarcoma from histological mimics. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(6):839-844.
- Hartel PH, Fanburg-Smith JC, Frazier AA, et al. Primary pulmonary and mediastinal synovial sarcoma: a clinicopathologic study of 60 cases and comparison with five prior series. *Mod Pathol*. 2007;20(7):760-769.
- Hornick JL, Sholl LM, Dai Cin P, et al. Expression of ROS1 predicts ROS1 gene rearrangement in inflammatory myofibroblastic tumors. *Mod Pathol*. 2015;28(5):732-739.
- Hung YP, Fletcher CD, Hornick JL. Evaluation of NKX2-2 expression in round cell sarcomas and other tumors with EWSR1 rearrangement: imperfect specificity for Ewing sarcoma. *Mod Pathol*. 2016;29(4):370-380.
- Ito J, Asano N, Kawai A, et al. The diagnostic utility of reduced immunohistochemical expression of SMARCB1 in synovial sarcomas: a validation study. *Hum Pathol*. 2016;47(1):32-37.
- Kosemehmetoglu K, Vrana JA, Folpe AL. TLE1 expression is not specific for synovial sarcoma: a whole section study of 163 soft tissue and bone neoplasms. *Mod Pathol*. 2009;22(7):872-878.
- Lantuejoul S, Issac S, Pinel N, et al. Clear cell tumor of the lung: an immunohistochemical and ultrastructural study supporting a pericytic differentiation. *Mod Pathol*. 1997;10(10):1001-1008.
- Le Loarer F, Watson S, Pierron G, et al. SMARCA4 inactivation defines a group of undifferentiated thoracic malignancies transcriptionally related to BAF-deficient sarcomas. *Nat Genet*. 2015;47(10):1200-1205.
- Mason EF, Fletcher CD, Sholl LM. 'Inflammatory myofibroblastic tumour'-like dedifferentiation of anaplastic lymphoma kinase-rearranged lung adenocarcinoma. *Histopathology*. 2016;69(3):510-515.
- Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, et al. Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features. *Cancer Sci*. 2013;104(2):266-273.
- McKenney JK, Weiss SW, Folpe AL. CD31 expression in intratumoral macrophages: a potential diagnostic pitfall. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(9):1167-1173.
- Miettinen M, Wang ZF, Paetau A, et al. ERG transcription factor as an immunohistochemical marker for vascular endothelial tumors and prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(3):432-441.
- Neuville A, Collin F, Bruneval P, et al. Intimal sarcoma is the most frequent primary cardiac sarcoma: clinicopathologic and molecular retrospective analysis of 100 primary cardiac sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):461-469.
- Oike T, Oglwara H, Tominaga Y, et al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res*. 2013;73(17):5508-5018.

- Pelmus M, Gillou L, Hostien I, et al. Monophasic fibrous and poorly differentiated synovial sarcoma: immunohistochemical reassessment of 60 t(X;18)(SYT-SSX)-positive cases. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(11):1434-1440.
- Perret R, Chalabreysse L, Watson S, et al. SMARCA4-deficient thoracic sarcomas: clinicopathologic study of 30 cases with an emphasis on their nosology and differential diagnoses. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(4):455-465.
- Prieto-Granada CN, Wiesner T, Messina JL, et al. Loss of H3K27me3 expression is a highly sensitive marker for sporadic radiation-induced MPNST. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(4):479-489.
- Rekhtman N, Montealvo J, Chang JC, et al. SMARCA4-deficient thoracic sarcomatoid tumors represent primarily smoking-related undifferentiated carcinomas rather than primary thoracic sarcomas. *J Thorac Oncol*. 2020;15(2):231-247.
- Satoh H, Takayashiki N, Shiozawa T, et al. Recurrent pulmonary synovial sarcoma effectively treated with amrubicin: a case report. *Exp Ther Med*. 2015;9(5):1947-1949.
- Sauter JL, Graham RP, Larsen BT, et al. SMARCA4-deficient thoracic sarcoma: a distinct clinicopathological entity with undifferentiated rhabdoid morphology and aggressive behavior. *Mod Pathol*. 2017;30(10):1422-1432.
- Schaefer IM, Fletcher CD, Hornick JL. Loss of H3K27 trimethylation distinguishes malignant peripheral nerve sheath tumors from histologic mimics. *Mod Pathol*. 2016;29(1):4-13.
- Shibuya R, Matsuyama A, Shiba E, et al. CAMTA1 is a useful immunohistochemical marker for diagnosis epithelioid haemangioendothelioma. *Histopathology*. 2015;67(6):827-835.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expression a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification. *Clin Cancer Res*. 2011;17(10):3341-3348.
- Terry J, Saito T, Subramanian S, et al. TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(2):240-246.
- Thway K, Fisher C. PEComa: morphology and genetics of a complex tumor family. *Ann Diagn Pathol*. 2015;19(5):359-368.
- Toki S, Wakai S, Sekimizu M, et al. PAX7 immunohistochemical evaluation of Ewing sarcoma and other small round cell tumors. *Histopathology*. 2018;73(4):645-652.
- Wallace WA, Dorward DA, Salter DM. Immunohistochemistry for small-cell carcinoma: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology*. 2019;74(5):792-794.
- Yamamoto H, Nozaki Y, Kohashi K, et al. Diagnostic utility of pan-TRK immunohistochemistry for inflammatory myofibroblastic tumours. *Histopathology*. Publicado en línea el 3 de octubre del 2019. doi:10.1111/his.14010
- Yoshida A, Goto K, Kodaira M, et al. CIC-rearranged sarcomas: a study of 20 cases and comparisons with Ewing sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(3):313-323.
- Yoshida A, Kobayashi E, Kubo T, et al. Clinicopathological and molecular characterization of SMARCA4-deficient thoracic sarcomas with comparison to potentially related entities. *Mod Pathol*. 2017;30(6):797-809.
- Yoshida A, Sekine, S, Tsuta K, et al. NKX2.2 is a useful immunohistochemical marker for Ewing sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(7):993-999.
- Yoshida A, Shibata T, Wakai S, et al. Anaplastic lymphoma kinase status in rhabdomyosarcomas. *Mod Pathol*. 2013;26(6):772-781.
- Yoshida A, Tsuta K, Ohno M, et al. STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):552-559.
- Yoshimoto T, Matsubara D, Nakano T, et al. Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung. *Pathol Int*. 2015;65(11):595-602.

Marcadores inmunitarios para la diferenciación de tumores metastásicos

16

Por Yasushi Yatabe, Phillipe Joubert, Sabina Berezowska, Daisuke Matsubara y Wendy A. Cooper

Introducción

La diferenciación entre el carcinoma pulmonar primario y una metástasis extrapulmonar es una tarea importante en la práctica de patología diagnóstica. La historia clínica, así como la comparación morfológica con cualquier tumor primario conocido, son importantes; sin embargo, la inmunohistoquímica (IHQ) proporciona un gran apoyo para la interpretación, en particular cuando no se dispone de los materiales previos para su revisión o cuando la evaluación morfológica tiene como resultado hallazgos contradictorios. En este capítulo se revisan los tipos y sitios comunes de tumores metastásicos al pulmón, con énfasis en la diferenciación de los tumores primarios de pulmón mediante IHQ.

¿La IHQ es útil para diferenciar el *carcinoma de células escamosas metastásico del carcinoma de células escamosas primario de pulmón*?

Diferenciar el carcinoma de células escamosas (CCE) primario de pulmón de un CCE metastásico originado en otro órgano es una tarea desafiante debido a que los CCE en lugares diferentes carecen de características morfológicas definidas. Además, el patrón de crecimiento tumoral y el grado de queratinización pueden cambiar, particularmente, luego de la quimioterapia y/o radioterapia. No existe un marcador IHQ que pueda ayudar de manera confiable a diferenciar un CCE de pulmón primario de uno metastásico, y se requiere de correlación clinicopatológica. Las pruebas genéticas para comparar el perfil molecular de los tumores pulmonares y extrapulmonares pueden ayudar a esta diferenciación, pero muchas veces no son factibles en la práctica clínica de rutina. La detección del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo es útil cuando el diagnóstico diferencial es con un CCE de orofaringe, endocérvix, vulva, ano y pene, puesto que los tumores de estos sitios con frecuencia son VPH+ (Plummer et al., 2016). La detección del VPH en tejido tumoral (por ejemplo, con hibridación *in situ* [ISH] de ARN o ADN del VPH u otras técnicas moleculares) favorece en gran medida la metástasis desde estos sitios, ya que se considera que la infección por VPH es excepcional en el CCE pulmonar primario. La IHQ para p16 es un marcador indirecto del VPH; no obstante, alrededor del 20 % de los carcinomas pulmonares no microcíticos (CPNM) primarios tienen una expresión difusa e intensa de p16 a pesar de la falta de infección por VPH (Bishop et al., 2012; Chang et al., 2015), por lo que este énfasis no es del todo

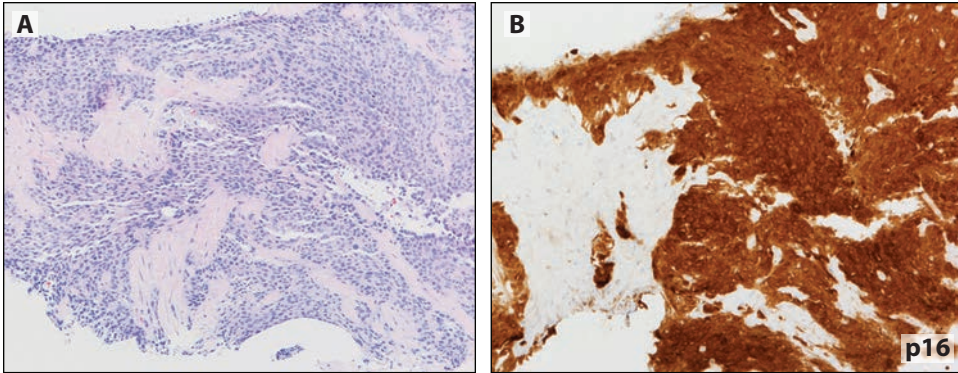


Figura 16-1. Muestra de biopsia por aguja fina de una lesión pulmonar en un paciente con historia de carcinoma orofaríngeo por virus del papiloma humano (VPH+). **(A)** Las características morfológicas no permiten diferenciar entre una metástasis o un carcinoma de células escamosas (CCE) de pulmón primario. **(B)** La tinción difusa e intensa de la inmunohistoquímica (IHQ) para p16 sugiere un carcinoma orofaríngeo metastásico. Sin embargo, p16 también se puede sobreexpresar en el cáncer de pulmón primario sin infección por VPH, y se requieren más pruebas moleculares para confirmar la presencia de VPH para un diagnóstico más definitivo.

confiable. La [figura 16-1](#) es un ejemplo de una metástasis pulmonar de cáncer orofaríngeo VPH+ que exhibe una IHQ positiva para p16. Se deben emplear criterios diagnósticos estrictos cuando se evalúa p16 y, de acuerdo con las pautas del *College of American Pathologists* para la evaluación del CCE orofaríngeo (Lewis et al., 2018), se debe considerar un p16 positivo cuando se observa una expresión nuclear y citoplasmática de intensidad moderada de al menos el 70 %.

Resumen de respuesta

No existe ningún marcador de IHQ que pueda ayudar de forma fiable a diferenciar el CCE pulmonar metastásico del primario. Se requiere una correlación clinicopatológica.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los tumores metastásicos originados en el tracto gastrointestinal de los tumores primarios de pulmón?

El tracto gastrointestinal (GI) es la fuente más común de metástasis pulmonares y representa más del 35 % de todas las lesiones pulmonares de origen extrapulmonar (Casiraghi et al., 2011). Se recomienda enfáticamente la revisión morfológica de la patología de cualquier tumor previo del tracto GI para comparar las características morfológicas cuando se evalúa una metástasis pulmonar potencial. En general, la IHQ para citoqueratina 7 (CK7) y 20 (CK20) es útil debido a que la mayoría de los adenocarcinomas pulmonares muestran un perfil CK7+/CK20-, mientras que los carcinomas del tracto GI inferior muestran un inmunofenotipo CK7-/CK20+ consistente (Jagirdar, 2008; Bahrami et al., 2008). Sin embargo, en los carcinomas pancreatobiliares y del tracto GI superior (estómago y esófago), la reactividad para CK7/CK20 es variable, y se pueden observar fenotipos mixtos, incluyendo perfiles CK7-/CK20+, CK7+/CK20- y CK7+/CK20+ (Selves et al., 2018). La adición de tinciones IHQ específicas pulmonares (factor de transcripción tiroideo 1 [TTF1] y/o napsina A) y del tracto GI (CDX2) es útil para confirmar un origen pulmonar en comparación con uno GI (Bahrami et al., 2008; Jagirdar, 2008). El TTF1 y las tinciones monoclonales para napsina A son positivas en el 80 % de los adenocarcinomas pulmonares, y raras veces se expresan en los carcinomas del tracto GI (Turner et al., 2012; Bishop et al., 2010; Rekhtman y Kazi, 2015; Ordonez, 2012b; Ye et al., 2011). Por el contrario, CDX2 se expresa en un bajo porcentaje de adenocarcinomas pulmonares, pero es clara y difusamente positivo en la gran mayoría de los carcinomas del tracto GI inferior, mientras que muestra una inmunorreactividad variable en

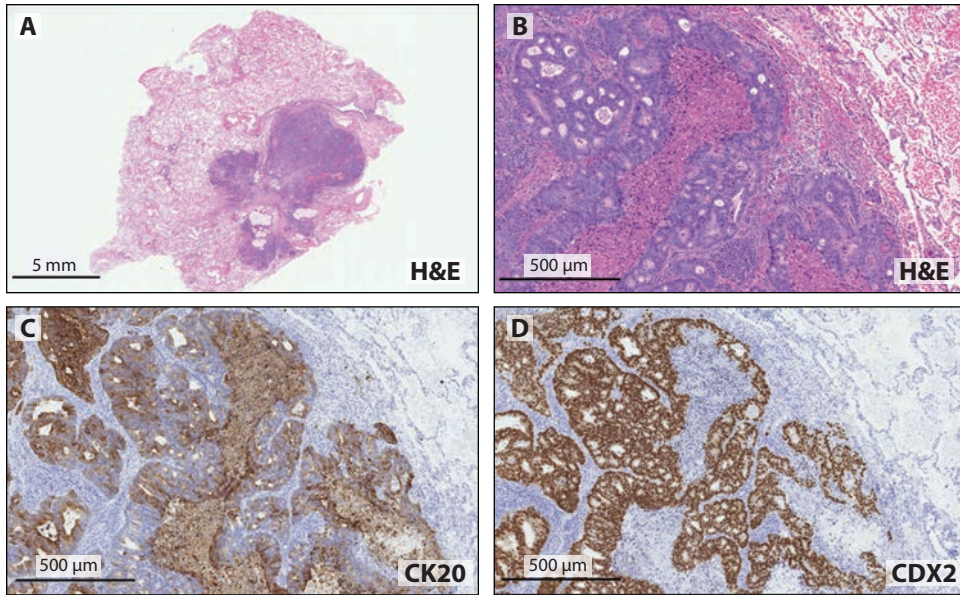


Figura 16-2. (A y B) Metástasis pulmonares de un adenocarcinoma de colon, que se caracteriza por glándulas cribiformes y necrosis sucia (H&E). Como se esperaba, el tumor muestra (C y D) un resultado claramente positivo tanto para citoqueratina 20 (CK20) como para CDX2.

los carcinomas pancreatobiliares y en los del tracto GI superior (Cowan et al., 2016; Werling et al., 2003; Kaimaktchiev et al., 2004) (figura 16-2). Cabe anotar que el CDX2 se puede expresar en la variante entérica del adenocarcinoma pulmonar (Nottegar et al., 2018). En estos casos, las tinciones para TTF1 y napsina A son frecuentemente negativas, pero en la mayoría de los casos se observan resultados positivos para CK7, lo que puede ayudar a diferenciarlo de una metástasis colónica. En esta situación, se debe excluir clínicamente un tumor primario del tracto GI. Los marcadores CDX2, TTF1 y CK7/CK20 también se pueden expresar en diferentes niveles en el adenocarcinoma mucinoso invasivo pulmonar primario (CK7+ y, a menudo, CK20+, CDX2+ y TTF1-), lo que enfatiza la importancia de la correlación clínica y radiológica (Selves et al., 2018). En la mayoría de los adenocarcinomas mucinosos invasivos de pulmón primarios se expresa un nuevo marcador IHQ, el factor nuclear 4α de hepatocitos (HNF4α), pero como es un factor de transcripción de diferenciación intestinal primario, también se expresa en los adenocarcinomas GI y pancreáticos, por lo que no es útil para diferenciarlos (Sugano et al., 2013).

La expresión de TTF1 o CDX2 también es útil para confirmar el origen de una neoplasia neuroendocrina bien diferenciada dada su alta especificidad (Kyriakopoulos et al., 2018). Se ha demostrado positividad en la inmunotinción para CDX2 en el 91 % y 83 % de las neoplasias neuroendocrinas yeyunoileales y apendiculares metastásicas, pero con menos frecuencia en los tumores duodenales (31 %), gástricos (14 %), pancreáticos (16 %) y rectales (29 %) (Erickson et al., 2004; Srivastava y Hornick, 2009). TTF1 también muestra una alta especificidad para los carcinoides pulmonares, aunque la sensibilidad es limitada en estos tumores, pues oscila entre el 33 % y el 46 % (Srivastava y Hornick, 2009; Chan et al., 2012; Zhang et al., 2014). Cabe mencionar que los marcadores TTF1 y CDX2 no son útiles en el carcinoma microcítico, dada su especificidad y sensibilidad limitadas en este tipo tumoral (Kaufmann y Dietel, 2000; Agoff et al., 2000).

Resumen de respuesta

Una combinación de IHQ para citoqueratinas (CK7/CK20), marcadores de pulmón (TTF1/napsina A) y del tracto GI (CDX2) es útil para confirmar una metástasis de origen en el tracto GI. En los tumores TTF1/napsina A negativos, la positividad para CDX2 apunta a una metástasis en el tracto GI. En los tumores TTF1/napsina A/CDX2 negativos, el perfil CK7/CK20 puede ser útil, pero normalmente se requiere una correlación clínica y radiológica para confirmar el origen.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen mamario del carcinoma pulmonar primario?

La diferenciación entre un adenocarcinoma de pulmón primario y un cáncer de mama metastásico a pulmón es una situación clínica que ocurre con frecuencia, debido a la alta incidencia del cáncer de mama y el hecho de que las pacientes con este tipo de cáncer tienen mayor riesgo de desarrollar una segunda neoplasia maligna no mamaria, incluyendo el cáncer de pulmón (Mellekjær et al., 2006). Los carcinomas de mama son el tercer tipo más frecuente de metástasis epiteliales observadas en el pulmón (Casiraghi et al., 2011), y vale la pena enfatizar la importancia de la correlación clinicopatológica en la diferenciación entre un tumor primario y uno metastásico. Cuando está disponible, la revisión de la patología de la lesión mamaria previa para comparación es de suma utilidad. No obstante, la diferencia histopatológica entre una metástasis mamaria y un carcinoma de pulmón no microcítico primario puede ser todo un desafío, sobre todo en el caso de las lesiones poco diferenciadas.

La gran mayoría de carcinomas de pulmón y de mama comparten un perfil similar de expresión de citoqueratinas (CK7+/CK20-), y es usual que se requieran inmunotinciones adicionales para confirmar la histogénesis (Chu et al., 2000). Además de los receptores de estrógeno y de progesterona, las tinciones útiles que favorecen una metástasis mamaria son aquellas que resultan positivas para GATA3 (sensibilidad: 32 %-100 %; especificidad: 71 %-93 %), mamaglobina (sensibilidad: 26 %-84 %; especificidad: 85 %-100 %) y proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica 15 (GCDFP-15) (sensibilidad: 15 %-74 %; especificidad: 93 %-100 %) (Hsu et al., 2016). En los carcinomas bien diferenciados, una combinación de tinciones negativas para TTF1 y/o napsina A con tinción positiva para receptor de estrógeno/receptor de progesterona (ER/PR) permite diferenciar una metástasis mamaria con sensibilidad y especificidad aceptables (Yang y Nonaka, 2010; Yatabe et al., 2019; Provenzano et al., 2016). En este contexto, la adición de napsina A solo incrementa ligeramente la sensibilidad y especificidad del TTF1, y es útil únicamente en un número limitado de casos (Yang y Nonaka, 2010).

En general, la tinción para GATA3 es útil para identificar un origen mamario debido a que exhibe una sensibilidad superior en comparación con ER, PR, mamaglobina o GCDFP-15 (Sangoi et al., 2016; Gown et al., 2016; Ni et al., 2018). A pesar de ello, se debe tener cuidado con la menor especificidad de GATA3, ya que se expresa en otros carcinomas no mamaros, en particular el carcinoma urotelial y, en menor extensión, en los carcinomas pancreáticos, algunos carcinomas cutáneos y otros (Miettinen et al., 2014). GATA3 (Vidarsdóttir et al., 2019) y ER (Yang y Nonaka, 2010) se expresan con poca frecuencia en los adenocarcinomas de pulmón, mientras que TTF1 se puede expresar en un pequeño porcentaje de carcinomas de mama (Ordóñez, 2012b). Por lo tanto, la combinación de GATA3 con una tinción inmunohistoquímica que tenga una mayor especificidad para los carcinomas de mama, como la mamaglobina, se recomienda en pacientes con una lesión pulmonar y sin historia previa de cáncer de mama (Yang y Nonaka, 2010).

Recientemente, SOX10 ha surgido como un marcador útil para confirmar metástasis de cáncer de mama triple negativo (TNBC), ya que mejora significativamente la especificidad de

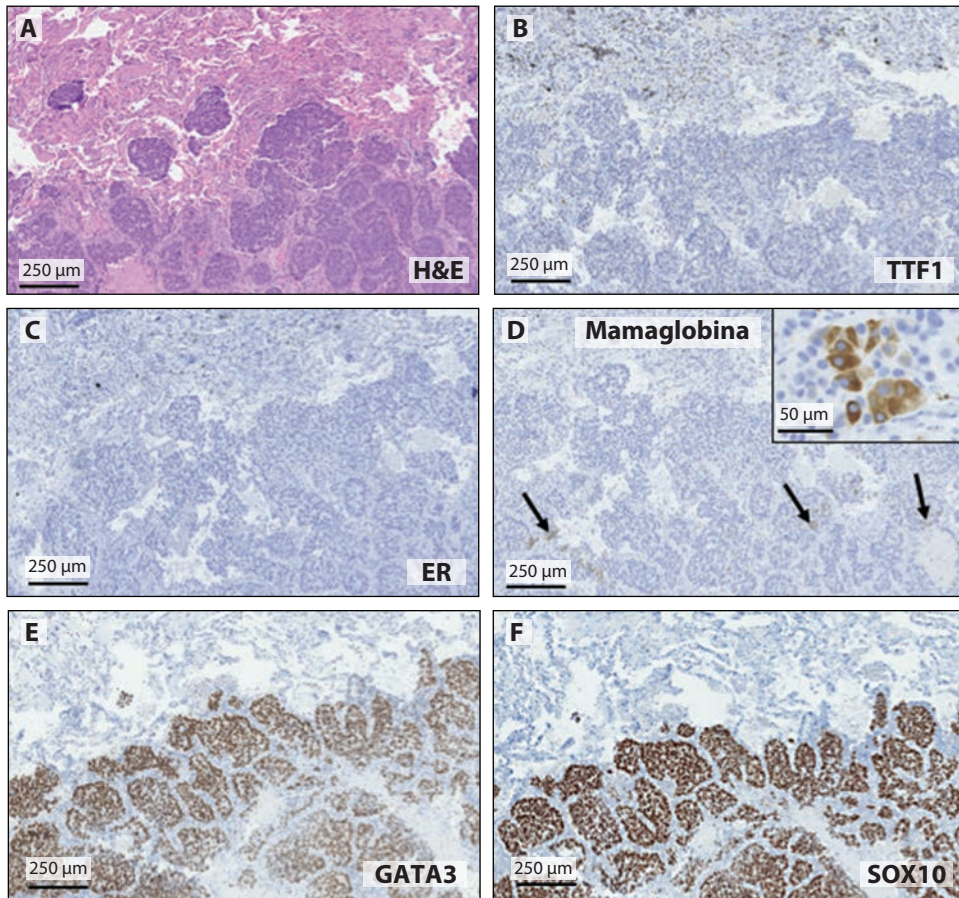


Figura 16-3. (A-F) Metástasis pulmonar de un carcinoma de mama triple negativo. (B) El factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y (C) el receptor de estrógeno (ER) son negativos. (D) Se muestra positividad focal para mamaglobina (*flechas y recuadro*), junto con positividad clara y difusa para (E) GATA3 y (F) SOX10.

GATA3 ([figura 16-3](#)). Estos tumores representan alrededor del 10 % al 20 % de los cánceres de mama y se caracterizan por un mayor riesgo de metástasis pulmonar, así como por la ausencia de ER/PR y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Foulkes et al., 2010). Se ha demostrado que una combinación de TTF1/napsina A (negativa), GATA3 (sensibilidad del 30,4 %) e inmunopositividad de SOX10 (sensibilidad del 62,3 %) permite identificar la gran mayoría de los TBNC (Tozbikian y Zynger, 2019; Laurent et al., 2019).

Resumen de respuesta

En cualquier paciente con antecedentes de carcinoma de mama, se recomienda la comparación con las características histológicas del tumor de mama primario, siempre que sea posible. En la mayoría de los casos, una combinación de marcadores pulmonares y mamarios que incluya TTF1 y/o napsina A y ER/PR o GATA3 puede proporcionar una respuesta definitiva. Cuando sea clínicamente relevante, el GATA3 se debe combinar con la mamaglobina para descartar una malignidad extramamaria como el carcinoma de vejiga. En el carcinoma de mama triple negativo (TNBC), se recomienda una combinación de marcadores pulmonares con GATA3 y SOX10 para diferenciar el carcinoma de mama metastásico del carcinoma de pulmón primario.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico originado en el tracto genital femenino del carcinoma pulmonar primario?

El diagnóstico de carcinoma metastásico del tracto genital femenino en pulmón puede representar un desafío, puesto que del 10 % al 20 % de los adenocarcinomas del cuello uterino, del endometrio y del ovario exhiben expresión de TTF1, incluso con el clon más específico del anticuerpo (Kubba et al., 2008; Siami et al., 2007) ([figura 16-4](#)). La positividad para TTF1 es particularmente alta en los adenocarcinomas mesonéfricos, de tipo mesonéfrico del cuello uterino y del endometrio (Pors et al., 2018; McFarland et al., 2016). Además, todos los carcinomas neuroendocrinos de alto grado pueden ser positivos para TTF1, sin importar su origen, incluyendo el tracto genital femenino. PAX8 es útil para diferenciar los carcinomas metastásicos del tracto genital femenino y el cáncer de pulmón primario, debido a que la mayoría de los carcinomas del tracto genital femenino (excluyendo los carcinomas cervicales escamosos) son positivos, mientras que los carcinomas de pulmón casi siempre son negativos (Laury et al., 2011; McHugh et al., 2019). La expresión de PAX8 también se puede observar en los tumores de otros lugares, incluyendo riñón, timo y tiroides (Ordóñez, 2012a).

Resumen de respuesta

Cuando el diagnóstico diferencial de un tumor de pulmón incluye un carcinoma metastásico del tracto genital femenino, el TTF1 se debe utilizar con precaución, ya que al igual que los adenocarcinomas primarios de pulmón, estos tumores también se pueden expresar con el TTF1. La tinción de PAX8 es útil para ayudar a identificar los tumores metastásicos que se originan en el tracto genital femenino.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen urotelial del carcinoma pulmonar primario?

Los pulmones son uno de los lugares donde más se presentan metástasis desde la vejiga (Goldman et al., 1979; Wallmeroth et al., 1999; Babaian et al., 1980), y el carcinoma urotelial es el tipo más común de cáncer vesical, representando más del 90 % de los tumores (Moch et al., 2016). La evaluación de las características morfológicas y la comparación con un tumor primario conocido podrían no ser suficientes para identificar el sitio primario, ya que algunos CCE pulmonares no queratinizantes se asemejan morfológicamente al carcinoma urotelial convencional (Travis et al., 2015). Además, hasta el 60 % de los carcinomas uroteliales muestran diferenciación escamosa (Amin, 2009). Puede ser difícil diferenciar los carcinomas uroteliales metastásicos del carcinoma

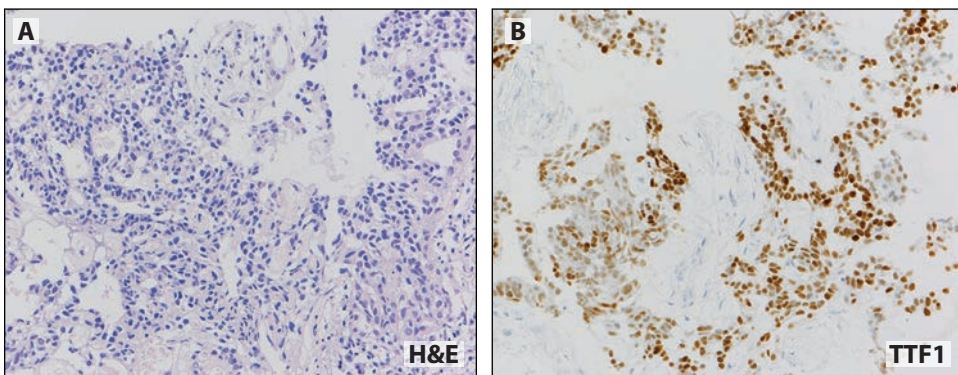


Figura 16-4. (A y B) Adenocarcinoma metastásico del cuello uterino, que muestra expresión del factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1).

pulmonar primario, especialmente en tumores poco diferenciados, aunque varios estudios sugieren que los marcadores inmunohistoquímicos pueden ser un complemento útil.

CK7, CK20 y GATA3 tienen más probabilidad de ser positivos en el carcinoma urotelial en comparación con el CCE pulmonar (100 % en comparación con el 33 %, 54 % en comparación con el 7 %, y 78 % en comparación con el 23 %, respectivamente) (figura 16-5) y, en contraste, CK14 y desmogleína 3 tienen más probabilidad de ser positivas en el CCE pulmonar en comparación con el carcinoma urotelial (77 % en comparación con el 32 % y 87 % en comparación con el 11 %, respectivamente) (Gruver et al., 2012).

La uroplaquina III es específica para el carcinoma urotelial, pero la sensibilidad no es muy alta (solo el 14 % de positividad) (Gruver et al., 2012). Se ha reportado que la uroplaquina II es un marcador más sensible que la uroplaquina III en el carcinoma urotelial (Li et al., 2014; Hoang et al., 2015), pero no se ha establecido por completo el papel de este marcador. Los marcadores escamosos p40 y p63 son positivos en la mayoría de los carcinomas uroteliales y los CCE pulmonares (Gruver et al., 2012; Gailey y Bellizzi, 2013), mientras que PAX8 es negativo (Laury et al., 2011), lo que hace que estos marcadores IHQ no sean útiles en la diferenciación entre estos tipos tumorales.

Resumen de respuesta

Una combinación de CK7, CK20 y GATA3 es muy útil para diferenciar el carcinoma urotelial metastásico del CCE pulmonar.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen renal del carcinoma pulmonar primario?

Los carcinomas renales metastásicos pueden imitar a los carcinomas pulmonares no microcíticos primarios y, además de la comparación morfológica con cualquier tumor primario conocido, la IHQ puede ayudar en la diferenciación. Aunque la napsina A puede ser positiva en los carcinomas de células renales (aproximadamente el 80 % en carcinomas papilares y

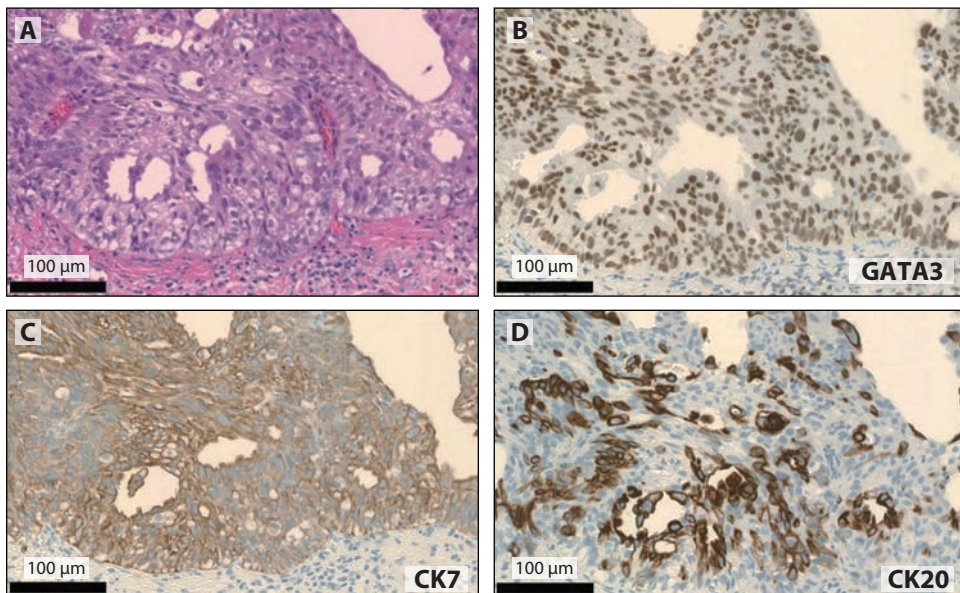


Figura 16-5. (A-D) El carcinoma urotelial metastásico (A) H&E es positivo con más frecuencia para (B) GATA3, (C) citoqueratina 7 (CK7) y (D) citoqueratina 20 (CK20) en comparación con el carcinoma de células escamosas pulmonar.

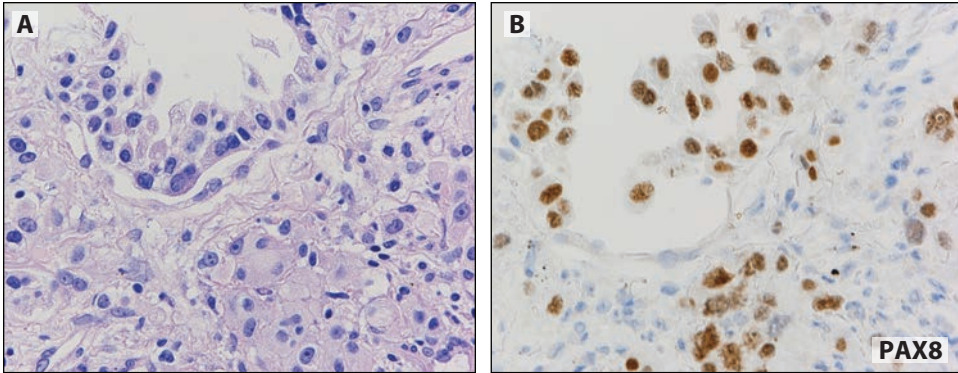


Figura 16-6. (A y B) Metástasis de carcinoma de células renales (**[A]** H&E). El tumor imita a un adenocarcinoma de pulmón con un patrón de crecimiento acinar y sólido. No obstante, el paciente tiene una historia de carcinoma previo de células renales claras. (**B**) La inmunohistoquímica (IHQ) para PAX8 mostró una tinción nuclear fuerte, lo que indica un carcinoma de células renales metastásico.

alrededor del 40 % en carcinomas convencionales de células claras), los carcinomas de células renales expresan PAX8 en la mayoría de los casos (>90 %) ([figura 16-6](#)), en comparación con la expresión poco común (0 % al 2 %) en el adenocarcinoma de pulmón. Además, casi todos los carcinomas de células renales claras, que representan el subtipo más común en hacer metástasis al pulmón, son positivos para anhidrasa carbónica IX (CA IX). TTF1 se expresa en la mayoría de los adenocarcinomas de pulmón, pero es negativo en los carcinomas de células renales (Bishop et al., 2010). CD10 no es útil para identificar carcinomas de células renales metastásicos, ya que también se expresa en varios cánceres, incluyendo al adenocarcinoma de pulmón (Gurel et al., 2012).

Resumen de respuesta

El PAX8 y el TTF1 son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico de células renales (PAX8+/TTF1-) del adenocarcinoma primario de pulmón (PAX8-/TTF1±). La napsina A no es útil en este contexto, ya que se expresa en una proporción variable de carcinomas de células renales.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar los carcinomas metastásicos de origen prostático del carcinoma pulmonar primario?

El cáncer de próstata metastásico es relativamente común y, en un estudio de 1589 casos, los pulmones fueron el segundo sitio metastásico más común (46 %), después de los huesos (Bubendorf et al., 2000). Las características morfológicas pueden ayudar a identificar el origen prostático de los tumores, los cuales muestran de manera típica patrones microacinares o tubulopapilares en las lesiones metastásicas pulmonares (Copeland et al., 2002) ([figura 16-7](#)).

Existen varios marcadores IHQ útiles para identificar el origen prostático de los tumores metastásicos pulmonares. CK7 y CK20, citoqueratinas de bajo peso molecular, son útiles debido a que es frecuente que el adenocarcinoma de próstata sea negativo tanto para CK7 como para CK20 (>80 %) (Bassily et al., 2000) ([figura 16-8](#)). Además, TTF1 casi siempre es negativo en el adenocarcinoma prostático (Goldstein, 2002).

Por muchos años se han usado el antígeno prostático específico (PSA), la fosfatasa ácida específica de la próstata (PSAP) y el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) como marcadores citoplasmáticos sensibles y específicos para el adenocarcinoma de la próstata, aunque la intensidad de la tinción a menudo es más débil en los tumores poco

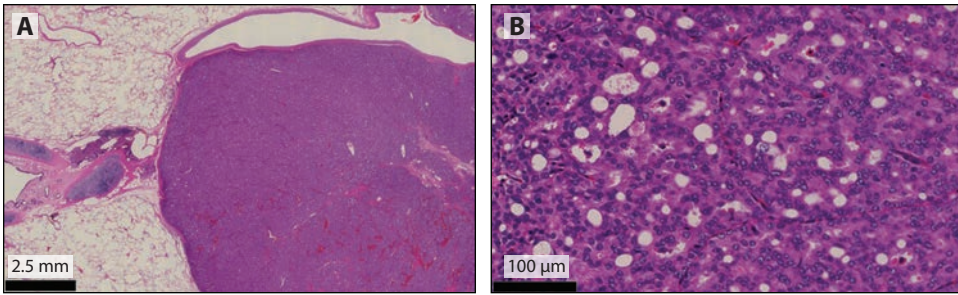


Figura 16-7. (A y B) Patrón típico de adenocarcinoma de próstata metastásico en el pulmón. **(A)** Tumor bien circunscrito con invasión linfática. **(B)** Patrón microacinar con formación de glándulas cribiformes.

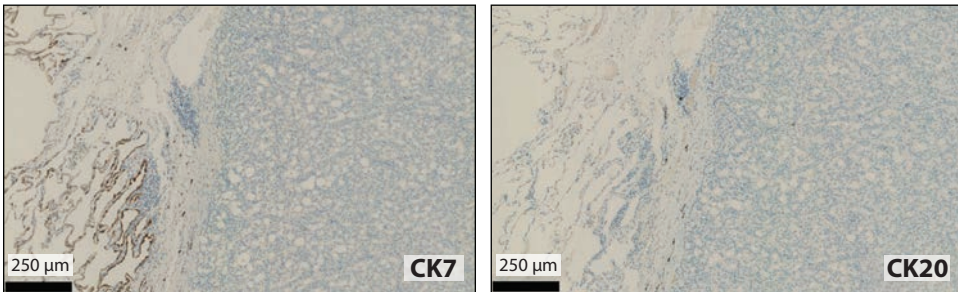


Figura 16-8. (A y B) El adenocarcinoma de próstata metastásico es negativo tanto para citoqueratina 7 (CK7) como para citoqueratina 20 (CK20) en la mayoría de los casos.

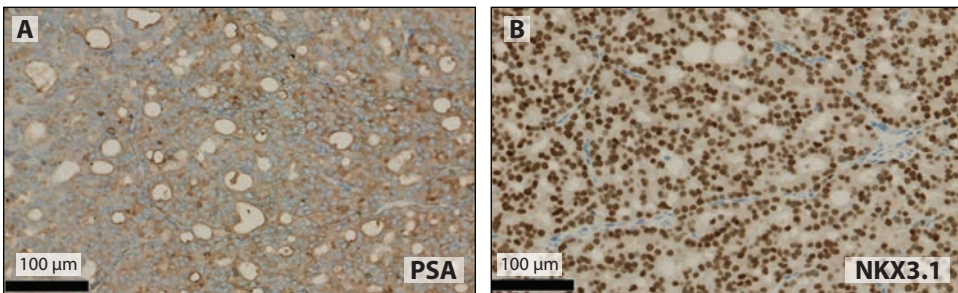


Figura 16-9. El adenocarcinoma de próstata metastásico es **(A)** positivo para antígeno prostático específico (PSA) en el citoplasma y **(B)** claramente positivo para NKX3.1 en los núcleos.

diferenciados (Chuang et al., 2007; Varma y Jasani, 2005). La tasa de detección es cercana al 85 % para el PSMA, del 80 % para el PSA y del 60 % para la PSAP en los adenocarcinomas de próstata metastásico (Kristiansen et al., 2017; Steffens et al., 1985).

El NK3 homeobox 1 (*NKX3.1*) es un gen de homeodominio regulado por andrógenos que se expresa de manera característica en el epitelio prostático (Abate-Shen et al., 2008). La IHQ para el NKX3.1 es un marcador nuclear altamente sensible para el adenocarcinoma de próstata (>98 % positivo), y varios estudios han reportado que el NKX3.1 es un marcador más sensible y específico que el PSA y la PSAP (Gurel et al., 2010; Gan et al., 2019) ([figura 16-9](#)).

Resumen de respuesta

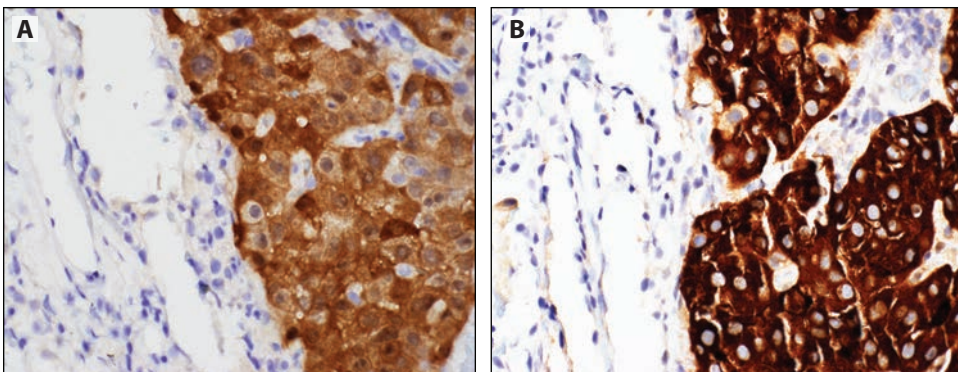
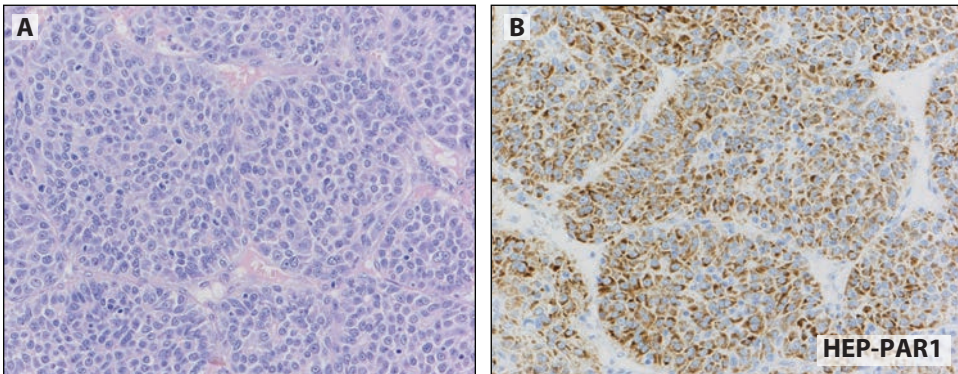
Se puede utilizar una combinación de CK7, CK20 y TTF1 negativos, junto con una tinción positiva para un marcador de próstata como el NKX3.1, para identificar el carcinoma prostático metastásico.

¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico de origen hepático del carcinoma pulmonar primario?

El diagnóstico del carcinoma hepatocelular (HCC) metastásico en el pulmón puede ser todo un desafío en algunos casos debido a que puede imitar a un carcinoma de pulmón no microcítico poco diferenciado. P40, CK7 y los marcadores neuroendocrinos siempre son negativos en el HCC, mientras que TTF1 puede mostrar una reacción citoplasmática aberrante en vez de una tinción nuclear. La parafina de hepatocitos 1 (HepPar1), la arginasa 1 y el glicicano 3 son marcadores inmunohistoquímicos útiles para identificar el HCC ([figuras 16-10 y 16-11](#)), siendo la arginasa 1 y el HepPar1 más sensibles para los tumores bien diferenciados, y la arginasa 1 y el glicicano 3 más sensibles para los tumores poco diferenciados (Nguyen et al., 2015). No obstante, recientemente se han reportado casos de adenocarcinoma hepatoide primario del pulmón (Haninger et al., 2014; Chandan et al., 2016), el cual se asemeja al HCC y es positivo para HepPar1, arginasa 1 y α -fetoproteína (AFP). Se requiere una correlación clínico-patológica prudente y una tinción positiva para CK7 a fin de diferenciar el adenocarcinoma hepatoide pulmonar de una metástasis del HCC.

Resumen de respuesta

Para identificar el carcinoma hepatocelular metastásico, se puede utilizar una combinación de marcadores hepatocelulares, como arginasa 1 y HepPar1, junto con marcadores negativos CK7 y pulmonares.



¿Qué marcadores de IHQ son útiles para diferenciar el carcinoma metastásico de origen tiroideo del carcinoma pulmonar primario?

Los carcinomas tiroideos metastásicos pueden tener características morfológicas superpuestas con el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Aunque el TTF1 se expresa en la mayoría de los carcinomas tiroideos (con excepción de los carcinomas anaplásicos, que casi siempre son negativos) y en la mayoría de los adenocarcinomas de pulmón, la napsina A usualmente es negativa en las neoplasias tiroideas (Nonaka et al., 2008; Bishop et al., 2010). PAX8 es un marcador nuclear que se expresa en los tumores de origen tiroideo, paratiroideo, del timo, renal y del tracto genital femenino, pero es negativo en los adenocarcinomas de pulmón (Ordóñez, 2012a) ([figuras 16-12 y 16-13](#)).

Resumen de respuesta

Una combinación de PAX8 y TTF1 positivos, junto con la ausencia de napsina A, es útil para identificar los carcinomas metastásicos de tiroides.

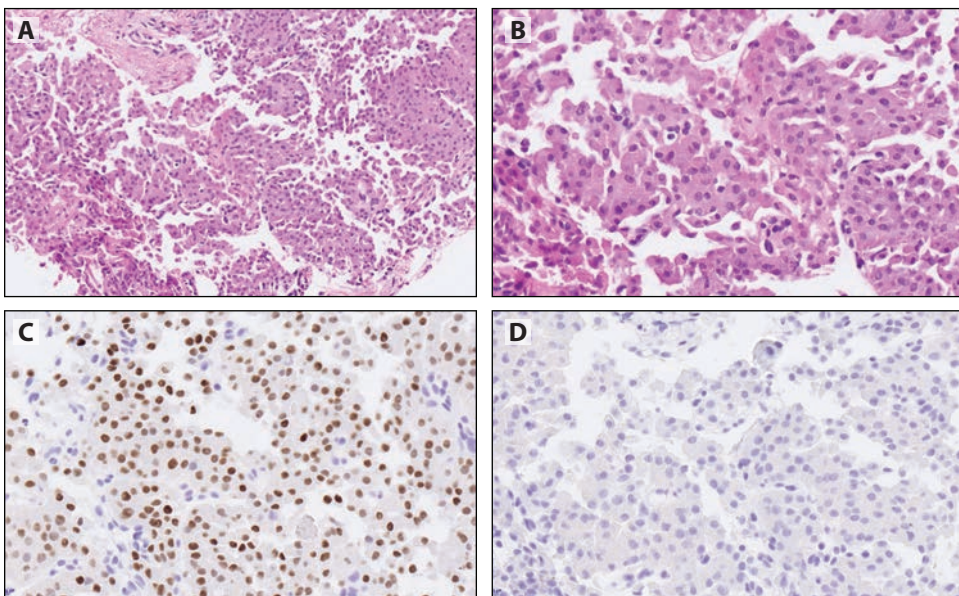


Figura 16-12. En pocas oportunidades, se requieren análisis inmunohistoquímicos adicionales en el caso de los tumores positivos para factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1), ya que dependen de la historia clínica del paciente. **(A y B)** Este tumor oncocítico citológicamente blando (**[A]** H&E) mostró **(C)** una fuerte expresión de TTF1. **(D)** Napsina A (monoclonal) es negativa.

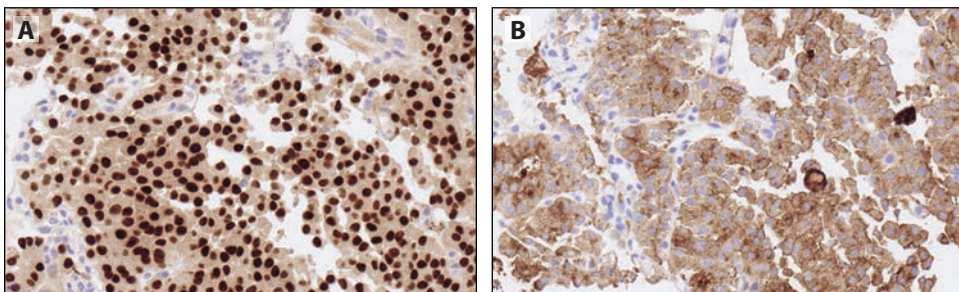


Figura 16-13. En el caso ilustrado en la figura 16-12 se realizaron inmuntinciones adicionales por medio de focalización, luego que se proporcionara la información clínica de una masa tiroidea. **(A)** La positividad en la inmunohistoquímica (IHQ) para PAX8 y **(B)** tiroglobulina demostró que esta era una metástasis de un tumor tiroideo.

Conclusiones

Aunque la evaluación morfológica minuciosa de cualquier tumor en el pulmón, junto con el acceso a la historia clínica y la comparación con la patología de cualquier otro tumor de otros lugares, es crucial para diferenciar los tumores primarios de las metástasis, es posible que este énfasis no sea suficiente para alcanzar un diagnóstico definitivo. La distinción precisa entre tumores primarios y metastásicos en el pulmón es crítica para un manejo apropiado del paciente y, en muchos casos, se requiere IHQ para confirmar o descartar metástasis pulmonares. No existen marcadores IHQ perfectamente precisos al determinar el origen de los tumores, y los patólogos deben ser conscientes de las fortalezas, las limitaciones y las dificultades al usar los diferentes marcadores IHQ que permiten lograr un diagnóstico más preciso.

Referencias

- Abate-Shen C, Shen MM, Gelmann E. Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation*. 2008;76(6):717-727.
- Agoff SN, Lamps LW, Philip AT, et al. Thyroid transcription factor-1 is expressed in extrapulmonary small cell carcinomas but not in other extrapulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 2000;13(3):238-242.
- Amin MB. Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Mod Pathol*. 2009;22(comp. 2):S96-S118.
- Babaian RJ, Johnson DE, Llamas L, et al. Metastases from transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology*. 1980;16(2):142-144.
- Bahrami A, Truong LD, Ro JY. Undifferentiated tumor: true identity by immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(3):326-348.
- Bassily NH, Vallorosi CJ, Akdas G, et al. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in prostate adenocarcinoma and bladder urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(3):383-388.
- Bishop JA, Ogawa T, Chang X, et al. HPV analysis in distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(1):142-148.
- Bishop JA, Sharma R, Illei PB, Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Hum Pathol*. 2010;41(1):20-25.
- Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*. 2000;31(5):578-583.
- Casiraghi M, De Pas T, Maisonneuve P, et al. A 10-year single-center experience on 708 lung metastasectomies: the evidence of the "International Registry of Lung Metastases." *J Thorac Oncol*. 2011;6(8):1373-1378.
- Chan ES, Alexander J, Swanson PE, et al. PDX-1, CDX-2, TTF-1, and CK7: a reliable immunohistochemical panel for pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(5):737-743.
- Chandan VS, Shah SS, Torbenson MS, et al. Arginase-1 is frequently positive in hepatoid adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 2016;55:11-16.
- Chang SY, Keeney M, Law M, et al. Detection of human papillomavirus in non-small cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*. 2015;46(11):1592-1597.
- Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*. 2000;13(9):962-972.
- Chuang AY, DeMarzo AM, Veltri RW, et al. Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(8):1246-1255.
- Copeland JN, Amin MD, Humphrey PA, et al. The morphologic spectrum of metastatic prostatic adenocarcinoma to the lung: special emphasis on histologic features overlapping with other pulmonary neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(4):552-557.
- Cowan ML, Li QK, Illei PB. CDX-2 expression in primary lung adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(1):16-19.
- Erickson LA, Papouchado B, Dimashkieh H, et al. CDX2 as a marker for neuroendocrine tumors of unknown primary sites. *Endocr Pathol*. 2004;15(3):247-252.
- Foulkes WD, Smit IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1938-1948.
- Gailey MP, Bellizzi AM. Immunohistochemistry for the novel markers glypican 3, PAX8, and p40 (Δ Np63) in squamous cell and urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(6):872-880.
- Gan Q, Joseph CT, Guo M, et al. Utility of NKX3.1 immunostaining in the detection of metastatic prostatic carcinoma on fine-needle aspiration smears. *Am J Clin Pathol*. 2019;152(4):495-501.
- Goldman SM, Fajardo AA, Naraval RC, et al. Metastatic transitional cell carcinoma from the bladder: radiographic manifestations. *AJR Am J Roentgenol*. 1979;132(3):419-425.

- Goldstein NS. Immunophenotypic characterization of 225 prostate adenocarcinomas with intermediate or high Gleason scores. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(3):471-477.
- Gown AM, Fulton RS, Kandalaf PL. Markers of metastatic carcinoma of breast origin. *Histopathology*. 2016;68(1):86-95.
- Gruver AM, Amin MB, Luthringer DJ, et al. Selective immunohistochemical markers to distinguish between metastatic high-grade urothelial carcinoma and primary poorly differentiated invasive squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(11):1339-1446.
- Gurel B, Ail TZ, Montgomery EA, et al. NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1097-1105.
- Gurel D, Kargi A, Karaman I, et al. CD10 expression in epithelial and stromal cells of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): a clinic and pathologic correlation. *Pathol Oncol Res*. 2012;18(2):153-160.
- Haninger DM, Kloecker GH, Bousamra Ii M, et al. Hepatoid adenocarcinoma of the lung: report of five cases and review of the literature. *Mod Pathol*. 2014;27(4):535-542.
- Hoang LL, Tacha D, Bremer RE, et al. Uroplakin II (UPII), GATA3, and p40 are highly sensitive markers for the differential diagnosis of invasive urothelial carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(10):711-716.
- Hsu C, Chiang AW, Hwang MJ, et al. Proteins with highly evolvable domain architectures are nonessential but highly retained. *Mol Biol Evol*. 2016;33(5):1219-1230.
- Jagirdar J. Application of immunohistochemistry to the diagnostic of primary and metastatic carcinoma to the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(3):384-396.
- Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2004;17(11):1392-1399.
- Kaufmann O, Dietel M. Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extra pulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology*. 2000;36(5):415-420.
- Kristiansen I, Stephan C, Jung K, et al. Sensitivity of HOXB13 as a diagnostic immunohistochemical marker of prostatic origin in prostate cancer metastases: comparison to PSA, prostatein, androgen receptor, ERG, NKX3.1, PSAP, and PSMA. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):E1151.
- Kubba LA, McCluggage WG, Liu J, et al. Thyroid transcription factor-1 expression in ovarian epithelial neoplasms. *Mod Pathol*. 2008;21(4):485-490.
- Kyriakopoulos G, Mavroei V, Chatzellis E, et al. Histopathological, immunohistochemical, and genetic and molecular markers of neuroendocrine neoplasms. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):252.
- Laurent E, Begueret H, Bonhomme B, et al. SOX10, GATA3, GCDFFP15, androgen receptor, and mammaglobin for the differential diagnosis between triple-negative breast cancer and TTF1-negative lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(3):293-302.
- Laury AR, Perets R, Piao H, et al. A comprehensive analysis of PAX8 expression in human epithelial tumors. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(6):816-826.
- Lewis JS Jr, Beadle B, Bishop JA, et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(5):559-597.
- Li W, Liang Y, Deavers MT, et al. Uroplakin II is a more sensitive immunohistochemical marker than uroplakin III in urothelial carcinoma and its variants. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(6):864-871.
- McFarland M, Quick CM, McCluggage WG. Hormone receptor-negative, thyroid transcription factor 1-positive uterine and ovarian adenocarcinomas: report of a series of mesonephric-like adenocarcinomas. *Histopathology*. 2016;68(7):1013-1020.
- McHugh KE, Arrossi AV, Farver CF, et al. Does strong and diffuse PAX-8 positivity occur in primary lung carcinoma? An immunohistochemical study of 418 cases and review of the literature. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(2):140-146.
- Mellemkjaer L, Friis S, Olsen JH, et al. Risk of second cancer among women with breast cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2285-2292.
- Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, et al. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(1):13-22.
- Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, et al. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 4.^a ed. World Health Organization; 2016.
- Nguyen T, Phillips D, Jain D, et al. Comparison of 5 immunohistochemical markers of hepatocellular differentiation for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(8):1028-1034.
- Ni YB, Tsang JYS, Shao MM, et al. GATA-3 is superior to GCDFFP-15 and mammaglobin to identify primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(1):25-32.
- Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, et al. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol*. 2008;21(2):192-200.

- Nottegar A, Tabbo F, Luchini C, et al. Pulmonary adenocarcinoma with enteric differentiation: immunohistochemistry and molecular morphology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(6):383-387.
- Ordóñez NG. Value of PAX8 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Adv Anat Pathol*. 2012;19(3):140-151. (a)
- Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(5):429-444. (b)
- Plummer M, de Martel C, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016;4(9):e609-616.
- Pors J, Cheng A, Leo JM, et al. A comparison of GATA3, TTF1, CD10, and calretinin in identifying mesonephric and mesonephric-like carcinomas of the gynecologic tract. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(12):1596-1606.
- Provenzano E, Byrne DJ, Russell PA, et al. Differential expression of immunohistochemical markers in primary lung and breast cancers enriched for triple-negative tumours. *Histopathology*. 2016;68(3):367-377.
- Rekhtman N, Kazi S. Nonspecific reactivity of polyclonal napsin A antibody in mucinous adenocarcinomas of various sites: a word of caution. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(4):434-436.
- Sangoi AR, Shrestha B, Yang G, et al. The novel marker GATA3 is significantly more sensitive than traditional markers mammaglobin and GCDFP15 for identifying breast cancer in surgical and cytology specimens of metastatic and matched primary tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(4):229-237.
- Selves J, Long-Mira E, Mathieu MC, et al. Immunohistochemistry for diagnosis of metastatic carcinomas of unknown primary site. *Cancers (Basel)*. 2018;10(4):E108.
- Siami K, McCluggage WG, Ordóñez NG, et al. Thyroid transcription factor-1 expression in endometrial and endocervical adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(7):1759-1763.
- Srivastava A, Hornick JL. Immunohistochemical staining for CDX-2, PDX-1, NESP-55, and TTF-1 can help distinguish gastrointestinal carcinoid tumors from pancreatic endocrine and pulmonary carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(4):626-632.
- Steffens J, Friedmann W, Lobeck H. Immunohistochemical diagnosis of the metastasizing prostatic carcinoma. *Eur Urol*. 1985;11(2):91-94.
- Sugano M, Nagasaka T, Sasaki E, et al. HNF4 α as a marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):211-218.
- Tozbikian GH, Zynger DL. A combination of GATA3 and SOX10 is useful for the diagnosis of metastatic triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2019;85:221-227.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4.^a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2015.
- Turner BM, Cagel PT, Sainz IM, et al. Napsin A, a new marker for lung adenocarcinoma, is complementary and more sensitive and specific than thyroid transcription factor 1 in the differential diagnosis of primary pulmonary carcinoma: evaluation of 1674 cases by tissue microarray. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(2):163-171.
- Varma M, Jasani B. Diagnostic utility of immunohistochemistry in morphologically difficult prostate cancer: review of current literature. *Histopathology*. 2005;47(1):1-16.
- Vidarsdottir H, Tran L, Nodin B, et al. Immunohistochemical profiles in primary lung cancers and epithelial pulmonary metastases. *Hum Pathol*. 2019;84:221-230.
- Wallmeroth A, Wagner U, Moch H, et al. Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT2-4): an autopsy study on 367 patients. *Urol Int*. 1999;62(2):69-75.
- Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, et al. CDX2, a highlight sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(3):303-310.
- Yang M, Nonaka D. A study of immunohistochemical differential expression in pulmonary and mammary carcinomas. *Mod Pathol*. 2010;23(5):654-661.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.
- Ye J, Findeis-Hosey JJ, Yang Q, et al. Combination of napsin A and TTF-1 immunohistochemistry helps in differentiating primary lung adenocarcinoma from metastatic carcinoma in the lung. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(4):313-317.
- Zhang C, Schmidt LA, Hatanaka K, et al. Evaluation of napsin A, TTF-1, p63, p40, and CK5/6 immunohistochemical stains in pulmonary neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(3):320-324.

Mesotelioma e inmunohistoquímica

17

Por Mauro Papotti, Andrew G. Nicholson y Sanja Dacic

Introducción

El mesotelioma pleural maligno (MPM) es una neoplasia pleural primaria altamente maligna que se presenta con morfología heterogénea, clasificada en subtipos epitelioide, sarcomatoide y bifásico. El diagnóstico se debe confirmar mediante la evaluación de marcadores inmunofenotípicos debido a la superposición morfológica con otros tumores, en especial con carcinomas que hacen metástasis con frecuencia en este sitio. Las pautas internacionales recomiendan que se evalúe mediante inmunohistoquímica (IHQ) de dos marcadores positivos de mesotelioma y dos marcadores no pertenecientes a mesotelioma. El panel ideal de marcadores para este propósito puede variar dependiendo de la morfología epitelioide o sarcomatoide de una proliferación maligna (Galateau-Salle et al., 2016; Churg et al., 2018; Chapel et al., 2019; Nicholson et al., 2020). La selección del panel de marcadores no se ve afectada por el tipo de muestra (biopsia pleural *en comparación con* muestra quirúrgica *en comparación con* citología de derrame) debido a que todos se desempeñan bien tanto en muestras fijadas en formalina como en muestras fijadas en alcohol.

¿Cuáles son los mejores marcadores para diferenciar el MPM epitelioide del carcinoma?

Se dispone de un gran número de marcadores inmunohistoquímicos a nivel comercial que se pueden utilizar en el diagnóstico diferencial del MPM epitelioide en comparación con el adenocarcinoma. El MPM epitelioide expresa de manera clara y difusa la mayoría de los marcadores “asociados a mesotelioma”. Una de las mejores combinaciones de marcadores positivos de mesotelioma es la calretinina y la proteína del tumor de Wilms 1 (WT1), con una precisión diagnóstica reportada de hasta el 87 %, seguida por la citoqueratina 5/6 (CK5/6) y D2-40. Los marcadores de uso más común para el diagnóstico del adenocarcinoma son la claudina 4, MOC31, antígeno carcinoembrionario (CEA) monoclonal, B72.3, Ber-EP4 y BG8. El factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y napsina A son útiles para diagnosticar adenocarcinoma de pulmón. Se pueden considerar otros marcadores con base en la morfología y la historia clínica, como CDX2 (gastrointestinal), PAX8 (células renales, carcinoma tímico, ovárico), NKX3.1 (próstata) o marcadores de mama, como la proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP) y mamaglobina. Para el carcinoma de células escamosas es muy útil una positividad nuclear fuerte y difusa de p40 o p63, ya que los mesoteliomas pocas veces son focalmente positivos.

La tinción para calretinina en el MPM epitelioide a menudo es fuerte y difusa, tanto nuclear como citoplasmática ([figura 17-1](#)), con una sensibilidad reportada del 97 % y una especificidad del 87 % (Galateau-Salle et al., 2016; Le Stang et al., 2020). Cerca del 5 % al 10 % de los adenocarcinomas pueden expresar calretinina, pero la tinción usualmente es débil y focal, y tiende a ser citoplasmática.

WT1 muestra una expresión nuclear difusa en el MPM epitelioide, con una sensibilidad reportada del 88 % y una especificidad del 94 % (Le Stang et al., 2020). Los anticuerpos de la WT1 pueden presentar reactividad cruzada con las proteínas citoplasmáticas, incluyendo las de las células endoteliales, y esta reactividad no se debe malinterpretar como si estuviera relacionada con el MPM. En lugar de eso, solo la reactividad nuclear de cualquier intensidad

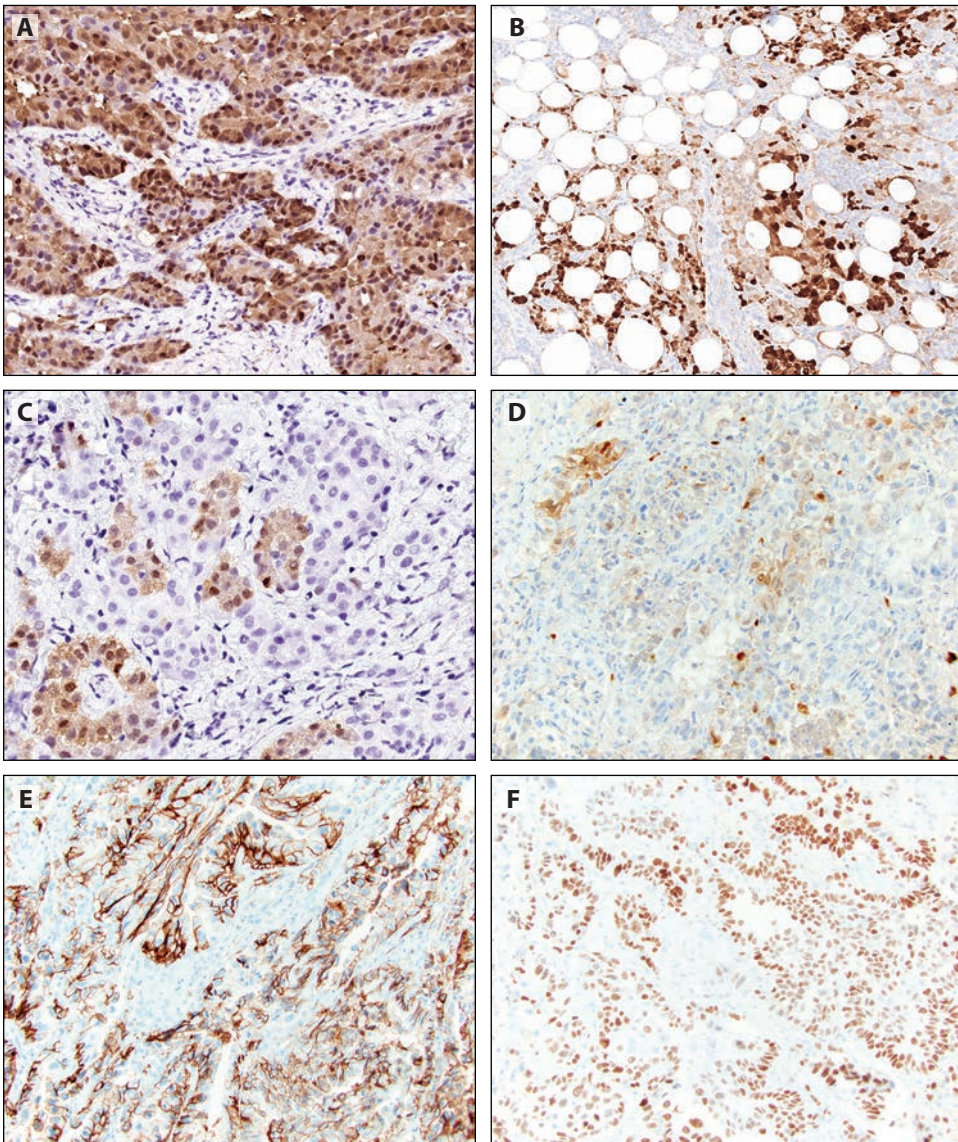


Figura 17-1. (A) Expresión calretinina citoplasmática y nuclear difusa en un mesotelioma epitelioide, con (B) infiltración extensa del tejido adiposo por células aisladas o racimos pequeños. (C) En otro caso de mesotelioma epitelioide, la calretinina solo se expresa de manera débil y focal. (D) Ejemplo de adenocarcinoma con expresión focal y débil de calretinina; sin embargo, los marcadores de “carcinoma” (E) BerEP4 y (F) factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) confirman el diagnóstico de adenocarcinoma.

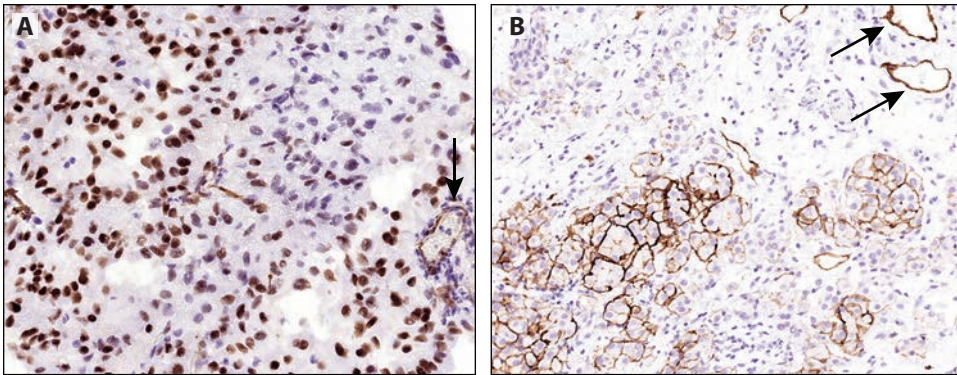


Figura 17-2. (A) La expresión nuclear de proteína del tumor de Wilms 1 (WT1) de intensidad variable en los mesoteliomas epitelioides puede ser difusa o focal. Cabe anotar que las células endoteliales de los vasos pequeños también expresan WT1 (*flechas*). (B) D2-40 a menudo muestra una tinción de membrana fuerte en la mayoría de las células neoplásicas del mesotelioma epitelioides. De manera similar a WT1, este marcador tiñe las células endoteliales, mayormente en los MPM linfáticos (*flecha*).

se considera como indicativa de mesotelioma (Husain et al., 2018) ([figura 17-2](#)). La WT1 es negativa en el adenocarcinoma de pulmón, mientras que en algunos carcinomas, en particular el ovárico, puede ser positiva.

D2-40 (podoplanina) muestra tinción membranosa, a menudo difusa, entre el 90 % y el 100 % de los MPM epitelioides, junto con una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 68 % (Le Stang et al., 2020; He et al., 2017) ([figura 17-2](#)). También tiñe los MPM linfáticos. Alrededor del 15 % de los adenocarcinomas de pulmón pueden ser focalmente positivos.

Resumen de respuesta

La calretinina y la WT1 son los mejores marcadores mesoteliales positivos para el diagnóstico del MPM epitelioides. La claudina 4, el MOC31, el CEA monoclonal, el B72.3 y el Ber-EP4, en combinación con marcadores específicos según el sitio, son los mejores para diferenciar el carcinoma del MPM epitelioides.

¿Cuáles son los mejores marcadores para distinguir el MPM sarcomatoide del carcinoma sarcomatoide?

El análisis de tumores sarcomatoides de la pleura debe incluir, además de las citoqueratinas y los marcadores del mesotelioma, un panel de marcadores mesenquimales como la desmina, la proteína S100, miogenina, el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6), CD34, ERG, CD31, FLI1 y también marcadores de melanoma (HMB45 y melan A) (Galateau-Salle et al., 2016). Los marcadores del carcinoma, como claudina 4, MOC31, Ber-EP4 y CEA no son muy útiles en el diagnóstico diferencial de los tumores sarcomatoides, y no es necesario incluirlos en el panel, en particular si el tejido es limitado (Husain et al., 2018). En el diagnóstico diferencial de los carcinomas sarcomatoides, los marcadores específicos del órgano, del sitio y de la diferenciación, como TTF1 y p40, pueden ser útiles.

Los mesoteliomas sarcomatoides se tiñen de manera casi invariable, al menos focalmente, con citoqueratinas que incluyen AE1/AE3, CAM5.2 y los anticuerpos de pancitoqueratinas OSCAR y KL1 ([figura 17-3A](#)). La pancitoqueratina puede ser negativa hasta en el 7 % de los MPM sarcomatoides (Klebe et al., 2010). La expresión positiva de citoqueratina no se diferencia de los carcinomas sarcomatoides o de algunos sarcomas por sí sola, pero se debe considerar como el primer paso en el análisis y se debe interpretar junto con otros marcadores mesoteliales y no mesoteliales (Marchevsky et al., 2017). En algunos casos, se deben teñir múltiples bloques, si están disponibles, para demostrar la expresión de citoqueratina.

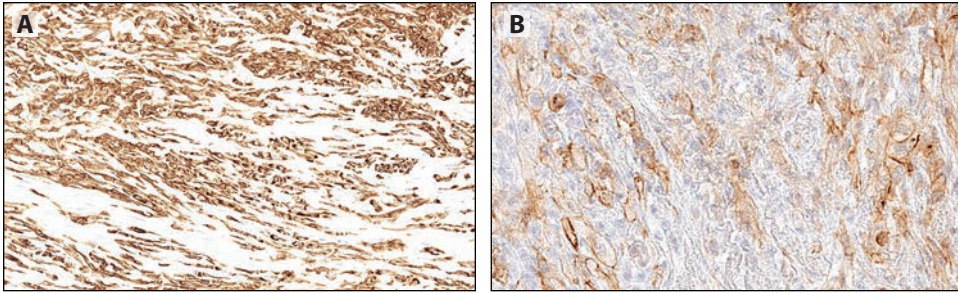


Figura 17-3. (A) Las citoqueratinas de amplio espectro (por ejemplo, clon AE1/AE3) se expresan con fuerza en las células fusiformes neoplásicas; el (B) D2-40 se expresa focalmente en este mesotelioma sarcomatoide con una tinción de membrana típica de algunas células tumorales fusiformes u ovaladas.

D2-40 (podoplanina) representa una alternativa confiable para apoyar un diagnóstico de MPM sarcomatoide debido a su mayor sensibilidad para resaltar las membranas celulares del mesotelioma neoplásico (Churg et al., 2018; Chapel et al., 2019; Nicholson et al., 2020) (figura 17-3B). Este marcador mesotelial es el más útil para establecer el diagnóstico de MPM sarcomatoide y es positivo en aproximadamente el 74 % de los casos (Marchevsky et al., 2017). La diferenciación de los vasos linfáticos puede ser todo un desafío en el MPM sarcomatoide, en especial en el caso de células fusiformes raras dispersas en un estroma desmoplásico. La reactividad endotelial no se debe malinterpretar como si estuviera relacionada con el tumor en los casos de MPM sarcomatoide. Esta distinción es de suma importancia debido a que D2-40 puede ser el único marcador de mesotelioma positivo (aunque expresado focalmente) en los casos poco comunes que no exhiben reactividad a calretinina, WT1 e incluso a citoqueratina.

La calretinina se expresa de forma más irregular en alrededor del 54 % de los MPM sarcomatoides, en donde puede ser focal o incluso estar ausente (figura 17-4A y B). La tinción nuclear se considera más específica del mesotelioma. La WT1 se expresa en cerca del 45 % de los MPM sarcomatoides (Marchevsky et al., 2017). La reactividad nuclear puede ser débil en algunos casos, pero se acepta como específica (Galateau-Salle et al., 2016) (Figura 17-4C).

Recientemente se sugirió la IHQ de GATA3 como un marcador para diferenciar el MPM sarcomatoide y el desmoplásico del carcinoma de pulmón sarcomatoide (Berg y Churg, 2017). En los mesoteliomas se observa una expresión fuerte y difusa de GATA3, mientras que los carcinomas sarcomatoides son mayormente negativos o muestran una tinción débil y en parches.

Resumen de respuesta

El MPM sarcomatoide se puede diagnosticar con marcadores positivos de citoqueratinas y mesoteliales, más frecuentemente el D2-40 y la calretinina, mientras que los marcadores de carcinoma son negativos. Si las citoqueratinas son negativas, el diagnóstico diferencial debe incluir los sarcomas, y se debe considerar una metodología diagnóstica que permita buscar fusiones/reordenamientos genéticos específicos.

¿Cuál es la función de las citoqueratinas en el diagnóstico del MPM?

Por lo general, la citoqueratina se expresa en todos los subtipos histológicos del MPM con una sensibilidad del 100 % para el MPM epitelioide (Le Stang et al., 2020). Es útil para excluir a los sarcomas, con dos condiciones: la primera es que los casos poco comunes de sarcoma pueden expresar citoqueratina (incluyendo casos de angiosarcoma y sarcoma sinovial), y la segunda es que existen casos poco comunes de MPM sarcomatoide que carecen de expresión de citoqueratina (7 %) (Klebe et al., 2010).

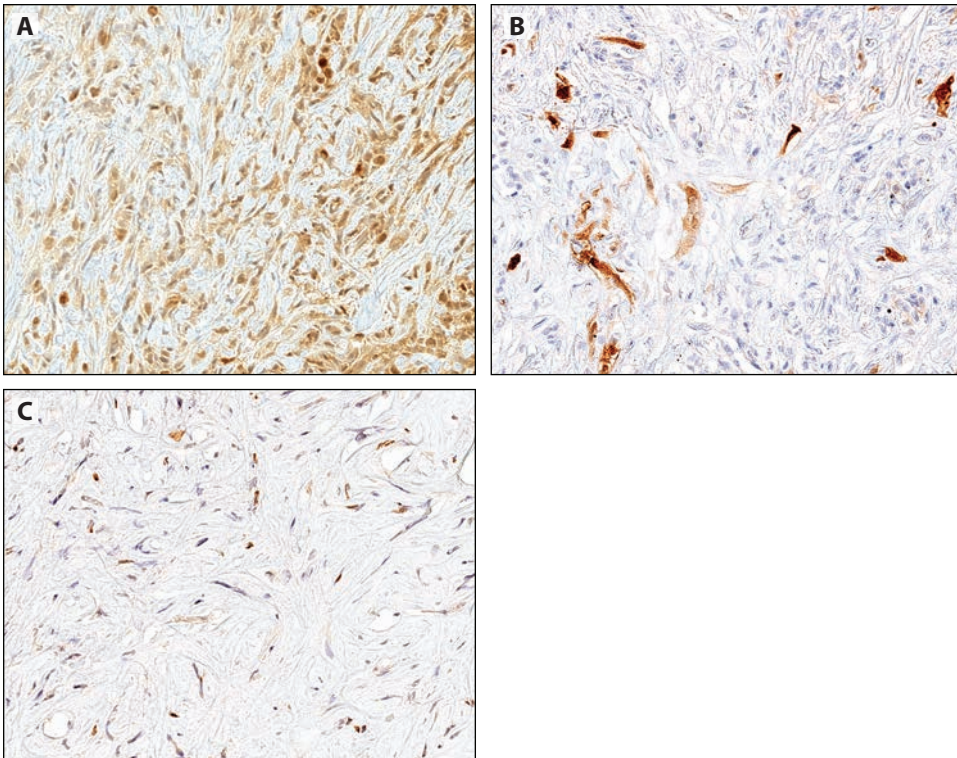


Figura 17-4. La calretinina se expresa de manera variable en estos dos ejemplos de mesoteliomas sarcomatoides que muestran reactividad (A) difusa y (B) focal. En algunos casos solo células aisladas poco comunes expresan este marcador. En ocasiones, la tinción puede ser débil (A) y se puede interpretar como inespecífica o como un artefacto, pero la positividad nuclear asociada puede representar un indicio útil de que la tinción es real. (C) Ejemplo de mesotelioma sarcomatoides con intensidad fuerte y débil de expresión de proteína del tumor de Wilms 1 (WT1) en núcleos neoplásicos fusiformes.

Entre los subtipos de citoqueratinas, se reporta que CK5/6 tiñe de manera específica al MPM cuando se evalúa contra la mayoría de los adenocarcinomas ([figura 17-5A](#)). Sin embargo, es esencial tener en cuenta que este mismo subtipo de citoqueratina también es expresado por los carcinomas de células escamosas de diversos sitios anatómicos, por lo que su uso es de valor limitado en el diagnóstico diferencial con las metástasis de carcinoma de células escamosas.

La citoqueratina también es expresada en el estroma reactivo de la pleuritis crónica y en el estroma que rodea al MPM epitelioide puro ([figura 17-5B](#) y [C](#)), aunque tiende a disminuir lejos de la superficie en concordancia con la maduración del estroma fibroblástico. Por ende, este marcador no tiene valor para diferenciar entre el mesotelioma y las proliferaciones mesoteliales reactivas (atípicas) en términos de expresión absoluta, ni su expresión en el estroma *per se* apoya un diagnóstico de MPM bifásico (Galateau-Salle et al., 2016). No obstante, es útil para ayudar a identificar células tumorales infiltrativas en el tejido adiposo de la pared torácica que podrían no ser visibles con facilidad en las tinciones de rutina con hematoxilina y eosina (H&E).

Las tinciones para citoqueratina pueden ayudar a identificar mesoteliomas sarcomatoides al tener un patrón de tinción irregular dentro del estroma fibroso, en especial en la parte profunda de la pleura, mientras que la tinción de las células fusiformes en la pleuritis reactiva tiende a disminuir a medida que se aleja de la superficie ([figura 17-6](#)). Por lo tanto, es importante orientar las muestras cuando se colocan en casetes para corte.

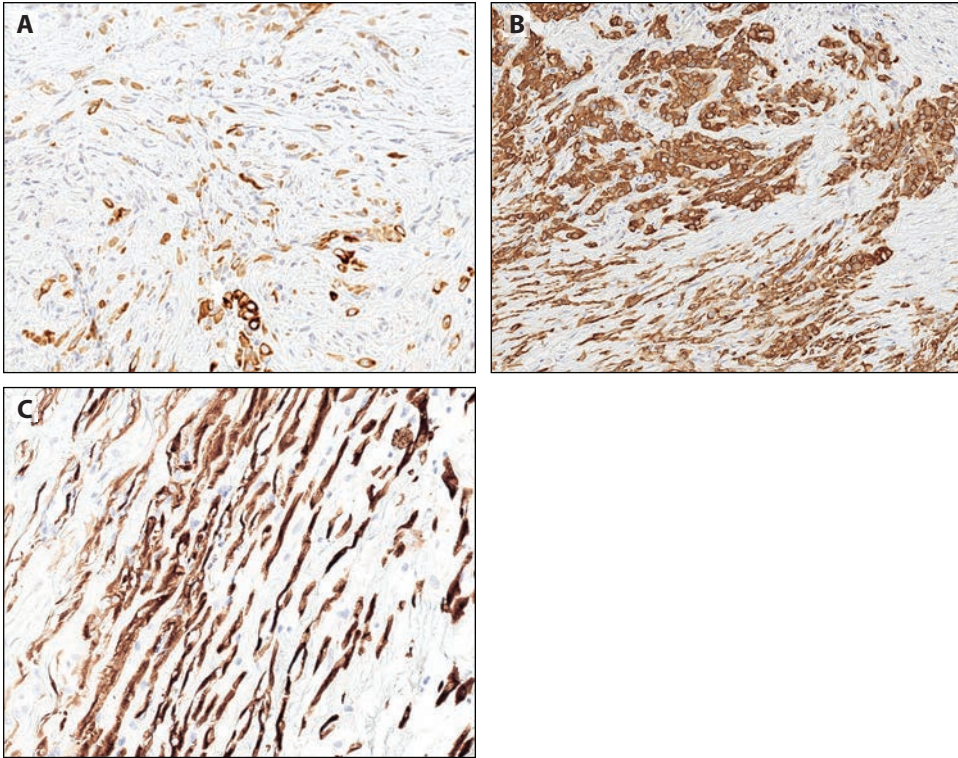


Figura 17-5. (A) Las citoqueratinas de alto peso molecular (por ejemplo, CK5/6) se expresan con fuerza en los racimos celulares de mesotelioma epitelioides y se pueden asociar con una tinción débil y focal de algunas células estromales no neoplásicas. (B y C) La citoqueratina de amplio espectro (por ejemplo, clon AE1/AE3), así como los clones específicos (por ejemplo, CK 5/6) tiñen células mesoteliales reactivas tanto neoplásicas como benignas y, por ende, este marcador es de valor limitado en el diagnóstico diferencial del mesotelioma de lesiones benignas con atipia reactiva marcada. Las células neoplásicas epitelioides y fusiformes de este mesotelioma bifásico (B), así como las células estromales reactivas de la pleuritis organizada esclerosante (C), expresan con fuerza citoqueratinas.

Resumen de respuesta

Las tinciones con citoqueratinas son útiles para resaltar la celularidad pleural en todo su espesor, la falta de zonificación y la presencia de invasión de células mesoteliales en el tejido adiposo de la pared torácica.

¿Qué marcadores inmunohistoquímicos se pueden utilizar para diferenciar entre proliferaciones mesoteliales benignas y malignas?

Un gran número de estudios apoyan el uso de la proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1) en el diagnóstico diferencial entre las proliferaciones mesoteliales atípicas benignas y el mesotelioma. BAP1 es una proteína desubiquitinizante con funciones oncosupresoras que tiene una función en la inhibición de la proliferación y crecimiento celular. Se expresa en el núcleo de todas las células normales. Las alteraciones somáticas del gen *BAP1* ubicado en el cromosoma 3p21 ocasionan la pérdida de la expresión proteica en las células neoplásicas, un evento que ocurre aproximadamente en el 65 % de los MPM epitelioides y el 20 % de los MPM sarcomatoides (Hida et al., 2017; Churg et al., 2018; Galateau-Salle et al., 2018). La recomendación reciente es la de no usar este marcador de manera aislada de otros datos morfológicos e inmunofenotípicos (Nicholson et al., 2020).

Excepto por las formas poco comunes de alteraciones de línea germinal de BAP1, la inmunorreactividad al BAP1 se preserva en todas las células no neoplásicas de los tejidos adiposos, vasculares y conectivos (figura 17-7).

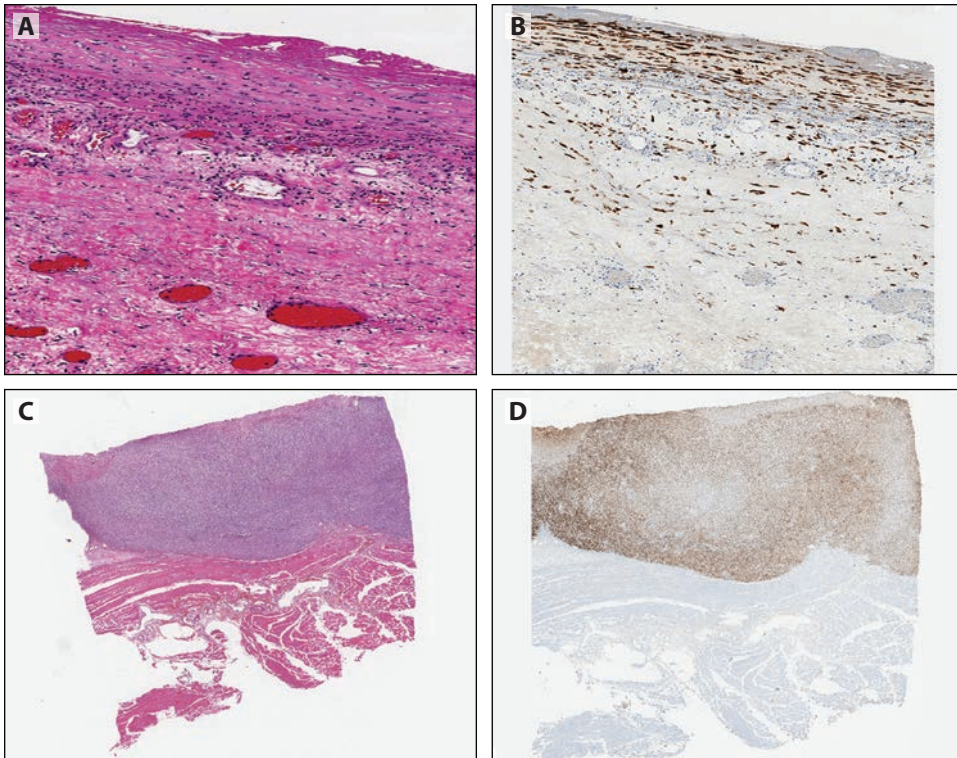


Figura 17-6. (A y B) La expresión de citoqueratina en la pleuritis fibrosante reactiva resalta la zonificación (hipercelularidad en la superficie y celularidad de profundidad reducida hacia la pared torácica) y una distribución horizontal de las células mesoteliales benignas, mientras que (C y D) la proliferación sarcomatoide maligna muestra un patrón de crecimiento desorganizado de células mesoteliales que ocupa todo el espesor pleural.

La IHQ para BAP1 puede ser útil para diferenciar las proliferaciones mesoteliales atípicas reactivas del MPM. La pérdida de tinción para BAP1 también es útil para establecer el diagnóstico de MPM epitelioides en muestras de líquido de citología ([figura 17-8](#)).

La IHQ para BAP1 también puede ser útil para establecer el diagnóstico de MPM bifásico. Su pérdida en las células tumorales epitelioides, pero no en las células estromales, representa un argumento contra un diagnóstico de MPM bifásico, incluso en presencia de células fusiformes atípicas, lo que en su lugar se puede interpretar como una reacción estromal ([figura 17-9](#)) (Righi et al., 2016; Galateau-Salle et al., 2018; Wu et al., 2017). Sin embargo, es necesario ser cuidadosos al hacer esta interpretación, ya que los casos ocasionales de mesotelioma bifásico pueden mostrar resultados discordantes entre los componentes epitelioides y estromales (Bueno et al., 2016). En dichos casos, pueden ser útiles otras pruebas complementarias, como la IHQ para metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para delección homocigota de *CDKN2A*.

Recientemente se ha propuesto la IHQ para MTAP como un marcador indirecto de las alteraciones genéticas *CDKN2A/p16*. La delección

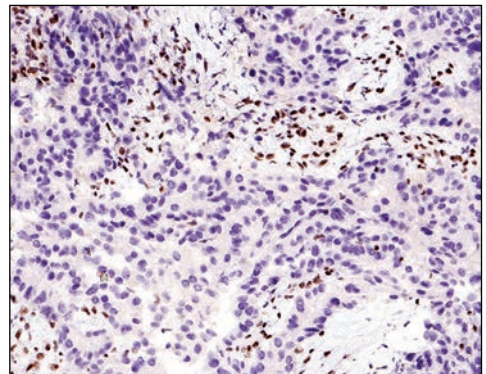


Figura 17-7. La proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1) está perdida en este mesotelioma epitelioides, según lo demostrado por la ausencia de tinción nuclear en células neoplásicas y por la expresión intacta en células estromales no neoplásicas.

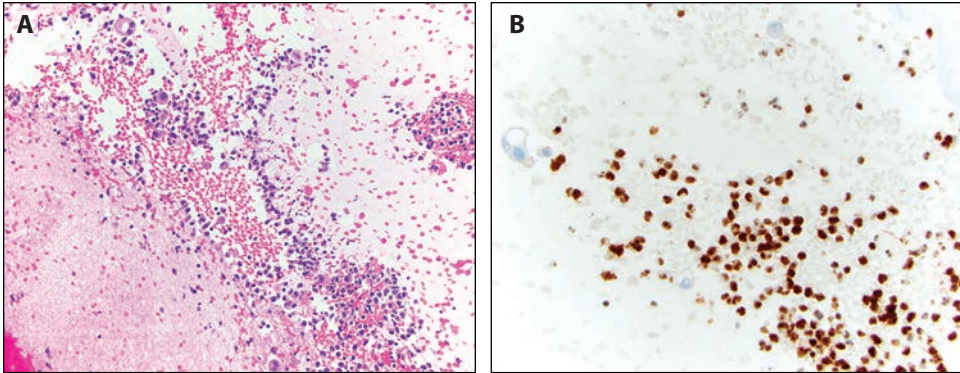


Figura 17-8. Muestra de líquido pleural con racimos dispersos de células mesoteliales atípicas y linfocitos. **(A)** Morfológicamente, este líquido pleural se interpretó como atípico. **(B)** Sin embargo, la pérdida de la expresión de proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1) en el mismo racimo de células mesoteliales confirma que, en efecto, son malignas.

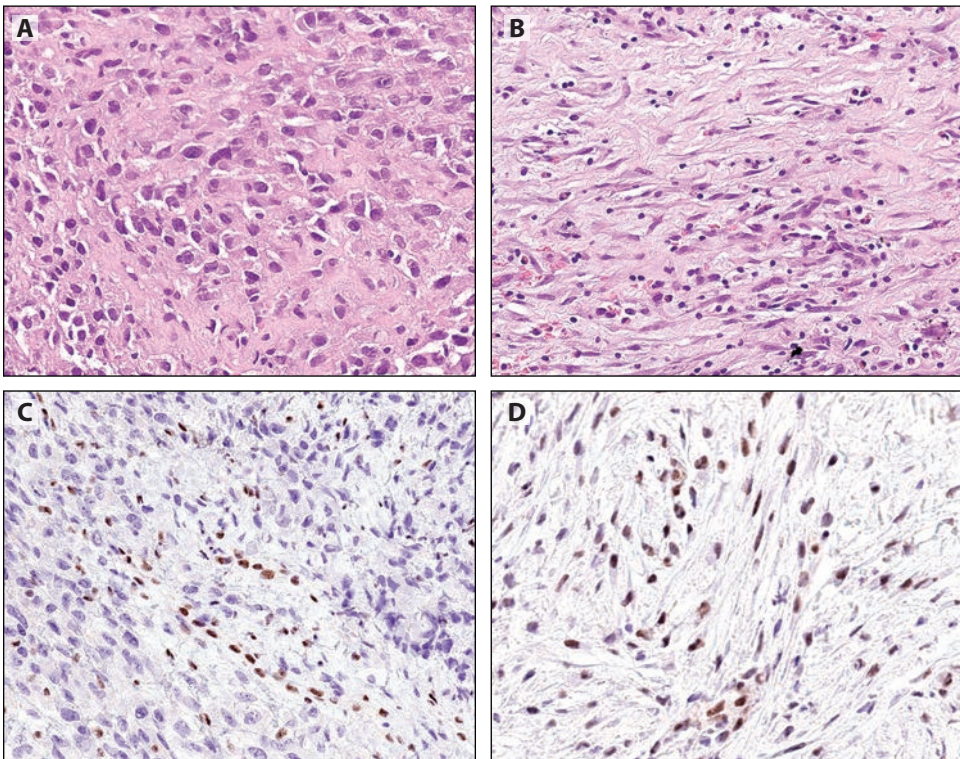


Figura 17-9. **(A)** Caso de mesotelioma bifásico sospechado con un componente celular epitelioides asociado a **(B)** un estroma marcadamente atípico. **(C)** La proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1) se pierde solamente en el componente epitelioides. **(D)** Una expresión intacta de BAP1 en las células estromales atípicas favorece su naturaleza reactiva más que la neoplásica, apoyando así un diagnóstico final de mesotelioma epitelioides (con reacción atípica del estroma).

homocigota del gen *CDKN2A* localizado en el cromosoma 9p21 es un marcador bien establecido de proliferaciones mesoteliales malignas que se pierde aproximadamente en el 70 % de los MPM epitelioides y en casi el 100 % de los MPM sarcomatoides (Illei et al., 2003; Chiosea et al., 2008; Husain et al., 2018). *MTAP* es una enzima involucrada en el metabolismo de las purinas, cuyo gen se ubica muy cerca de *CDKN2A* en el locus 9p21.3, y se ha reportado que se somete a deleciones en tándem con *CDKN2A* en hasta el 100 % de los MPM.

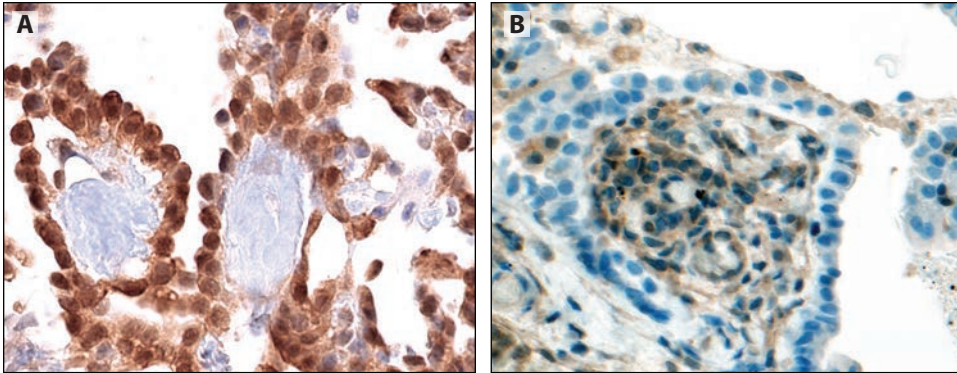


Figura 17-10. (A) Un mesotelioma papilar con el gen *CDKN2A* de tipo salvaje expresa de manera difusa la metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) en todas las células neoplásicas y también en las estromales. (B) Ejemplo de mesotelioma papilar con pérdida de MTAP. Las células neoplásicas que recubren el tallo papilar son negativas, mientras que las células estromales no neoplásicas expresan de manera regular la proteína.

En las células humanas normales y en el 30 % de los casos de MPM epitelioides de tipo salvaje, MTAP se expresa en el citoplasma y también en el núcleo de las células normales y de las neoplásicas ([figura 17-10A](#)).

Las deleciones de genes en las células del MPM se asocian con la pérdida de inmunorreactividad tanto nuclear como citoplasmática ([figura 17-10B](#)), en la que las células mesoteliales neoplásicas (negativas) se pueden diferenciar de las células estromales (que mantienen su expresión nuclear si son de naturaleza reactiva y no neoplásica). Cuando está presente, la pérdida de MTAP se observa en todas las células neoplásicas, y en solo el 10 % de los casos se encontró una pérdida parcial en una fracción de las células (Berg et al., 2018; Chapel et al., 2020).

También se reportó la pérdida de MTAP en hasta el 23 % de las proliferaciones mesoteliales reactivas (Zimling et al., 2012), un hallazgo no confirmado por otros autores (Hida et al., 2017) cuando la reactividad se interpretó como positiva de intensidad igual o mayor que la de las células inflamatorias (control interno).

Resumen de respuesta

La IHQ para BAP1 y MTAP (como sustituto para la deleción homocigota de *CDKN2A*) puede ser útil para diferenciar la proliferación mesotelial benigna de la maligna en muestras quirúrgicas y de fluidos.

Conclusiones

La IHQ es necesaria para confirmar el diagnóstico de mesotelioma maligno, ya que muchos casos tienen implicaciones medicolegales. Para el mesotelioma epitelioides, en un caso común desde el punto de vista morfológico, radiológico y clínico, la recomendación es usar dos marcadores de mesotelioma y dos marcadores de carcinoma para lograr el diagnóstico. Si los resultados son discordantes, se deben usar marcadores adicionales. Para el mesotelioma sarcomatoides se debe realizar tinción para citoqueratina, suplementada con el uso empírico de marcadores mesenquimales y mesoteliales, con la elección de anticuerpos que probablemente reflejan características morfológicas. A menudo, puesto que las especificidades y las sensibilidades son mucho menores que en los tumores epitelioides, la conclusión histopatológica es un equilibrio de probabilidades, y se requiere el aporte multidisciplinario. La IHQ para BAP1 y MTAP (como sustituto para deleción homocigota de *CDKN2A/p16*) es útil para separar las proliferaciones mesoteliales benignas de las malignas y para establecer el diagnóstico de mesotelioma maligno en muestras de derrame y muestras tisulares limitadas.

Referencias

- Berg KB, Churg A. GATA3 immunohistochemistry for distinguishing sarcomatoid and desmoplastic mesothelioma from sarcomatoid carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(9):1221-1225.
- Berg KB, Dacic S, Miller C, et al. Utility of methylthioadenosine phosphorylase compared with BAP1 immunohistochemistry, and CDKN2A and NF2 fluorescence in situ hybridization in separating reactive mesothelial proliferations from epithelioid malignant mesotheliomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(12):1549-1553.
- Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 2016;48(4):407-416.
- Chapel DB, Churg A, Santoni-Rugiu E, et al. Molecular pathways and diagnosis in malignant mesothelioma: a review of the 14th international conference of the international mesothelioma interest group. *Lung Cancer*. 2019;127:69-75.
- Chapel DB, Schulte JJ, Berg K, et al. MTAP immunohistochemistry is an accurate and reproducible surrogate for CDKN2A fluorescence in situ hybridization in diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Mod Pathol*. 2020;33(2):245-254.
- Chiosea S, Krasinkskas A, Cagle PT, et al. Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. *Mod Pathol*. 2008;21(6):742-747.
- Churg A, Nabeshima K, Ail G, et al. Highlights of the 14th international mesothelioma interest group meeting: pathologic separation of benign from malignant mesothelial proliferations and histologic/molecular analysis of malignant mesothelioma subtypes. *Lung Cancer*. 2018;124:95-101.
- Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, et al. The 2015 World Health Organization classification of tumors of the pleura: advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2016;11(2):142-154.
- Galateau-Salle F, Le Stang N, Nicholson AG, et al. New insights on diagnostic reproducibility of biphasic mesotheliomas: a multi-institutional evaluation by the International Mesothelioma Panel from the MESOPATH Reference Center. *J Thorac Oncol*. 2018;13(8):1189-1203.
- He C, Wang B, Wan C, et al. Diagnostic value of D2-40 immunostaining for malignant mesothelioma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(38):64407-64416.
- Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, et al. Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer*. 2017;104:98-105.
- Husain AN, Colby TV, Ordonez NG, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma 2017 update of the consensus statement from the international mesothelioma interest group. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(1):89-108.
- Illei PD, Rusch VS, Zakowski MF, et al. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleura mesotheliomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9(6):2108-2013.
- Klebe S, Brownlee NA, Mahar A, et al. Sarcomatoid mesothelioma: a clinical-pathologic correlation of 326. *Mod Pathol*. 2010;23(3):470-479.
- Le Stang N, Burke L, Blaizot G, et al. Differential diagnosis of epithelioid malignant mesothelioma with lung and breast pleural metastasis: a systematic review compared with a standardized panel of antibodies—a new proposal that may influence pathologic practice. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(4):446-456.
- Marchevsky AM, LeStang N, Hiroshima K, et al. The differential diagnosis between pleural sarcomatoid mesothelioma and spindle cell/pleomorphic (sarcomatoid) carcinomas of the lung: evidence-based guidelines from the International Mesothelioma Panel and the MESOPATH National Reference Center. *Hum Pathol*. 2017;67:160-168.
- Nicholson AG, Sauter JL, Nowak AK, et al. EURACAN/IASLC proposals for updating the histologic classification of pleural mesothelioma: towards a more multidisciplinary approach. *J Thorac Oncol*. 2020;15(1):29-49.
- Righi L, Duregon E, Vatrano S, et al. BRCA1-associated protein 1 (BAP1) immunohistochemical expression as a diagnostic tool in malignant pleural mesothelioma classification: a large retrospective study. *J Thorac Oncol*. 2016;11(11):2006-2017.
- Wu D, Hiroshima K, Yusa T, et al. Usefulness of p16/CDKN2A fluorescence in situ hybridization and BAP1 immunohistochemistry for the diagnosis of biphasic mesothelioma. *Ann Diagn Pathol*. 2017;26:31-37.
- Zimling ZG, Jorgensen A, Santoni-Rugiu E. The diagnostic value of immunohistochemically detected methylthioadenosine phosphorylase deficiency in malignant pleural mesotheliomas. *Histopathology*. 2012;60(6B):E96-105.

Tumores tímicos e inmunohistoquímica

18

Por Andre L. Moreira y William D. Travis

Introducción

Los tumores tímicos son poco comunes y tienen una prevalencia estimada de casi el 1 % en la población general (Araki et al., 2015; Siesling et al., 2012). La atención de los pacientes con estas lesiones incorpora características clínicas, de laboratorio e imagenológicas, a fin de determinar los diagnósticos diferenciales, la magnitud de la enfermedad y, más importante aún, la clasificación histopatológica. Las lesiones mediastinales anteriores, incluidas aquellas que involucran al timo, son heterogéneas etiológicamente, lo que se suma a la complejidad dependiendo del sitio. En este capítulo se respalda el uso de las tinciones inmunohistoquímicas en el diagnóstico diferencial de las masas mediastinales anteriores que se encuentran con mayor frecuencia, haciendo énfasis en el diagnóstico diferencial de las lesiones epiteliales tímicas (timoma, carcinoma tímico) y los tumores de células germinales.

¿Cuáles son los mejores marcadores para el diagnóstico del timoma?

A pesar de las diferentes clasificaciones histológicas, todos los timomas muestran un patrón similar de reactividad inmunohistoquímica. Los timomas están compuestos por células epiteliales tímicas (positivas para queratina) y linfocitos tímicos inmaduros (células positivas para desoxinucleotidil transferasa terminal [TdT], CD1a o CD99) (Marx et al., 2014) ([figura 18-1](#)). Esta combinación implica un diagnóstico de timoma en el contexto morfológico apropiado. No se recomiendan las tinciones para queratina 7 y 20 debido a que los timomas pueden ser negativos para ambos marcadores (Chu et al., 2000; Pomplun et al., 2002). Los linfomas pueden afectar al mediastino, y se pueden incluir en el diagnóstico diferencial de los timomas tipos B1 y B2 de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En este contexto, los linfomas linfoblásticos agudos, que son más comunes en adultos jóvenes y cuyas células tumorales son positivas para TdT, representan un obstáculo; no obstante, todos los linfomas carecen de células positivas para queratina.

Resumen de respuesta

Una combinación de queratina y TdT constituye el mejor panel para el diagnóstico del timoma. También se pueden usar CD1a o CD99 para marcar los linfocitos tímicos inmaduros.

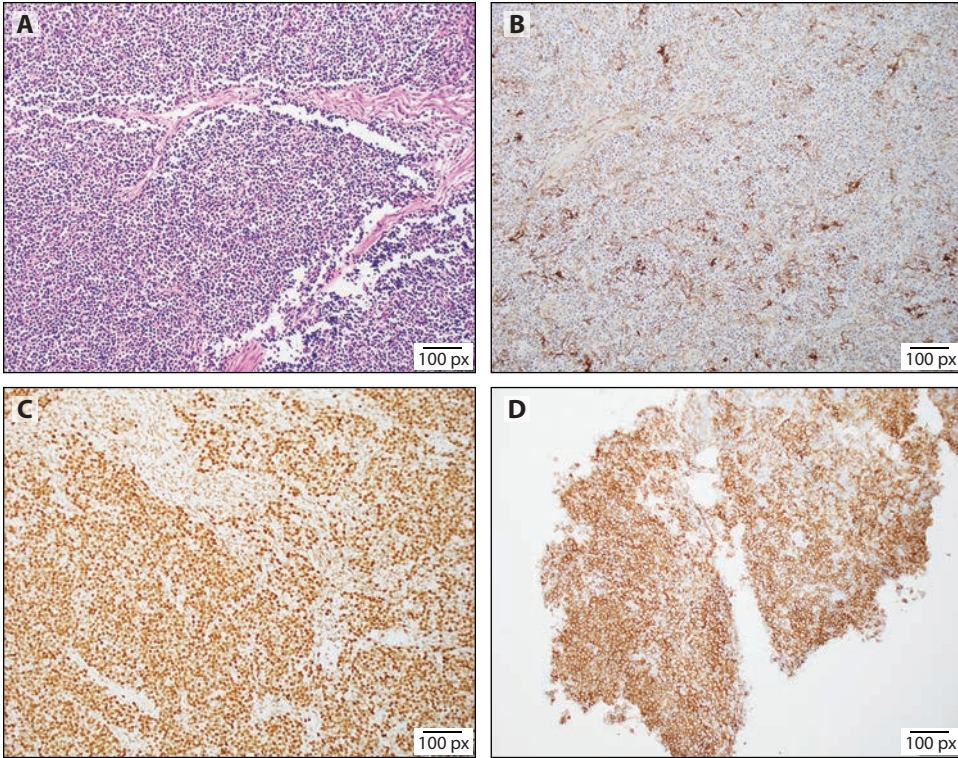


Figura 18-1. (A) Corte teñido con H&E de un timoma tipo B1 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que muestra bandas fibrosas, patrón de crecimiento lobular y linfocitos abundantes. Las células epiteliales no son evidentes a primera vista. (B) La tinción inmunohistoquímica para queratina (AE1/AE3) resalta las células epiteliales tímicas con distribución en malla. (C) La tinción inmunohistoquímica para TdT resalta los linfocitos tímicos. (D) La tinción inmunohistoquímica para CD1a resalta los linfocitos tímicos en una biopsia por aguja gruesa de un timoma tipo B2.

¿Qué otros marcadores se pueden utilizar para resaltar las células epiteliales tímicas?

Las células epiteliales tímicas son positivas para p40/p63 (Su et al., 2015; Marx et al., 2014) y PAX8 (Ordóñez, 2012; Asirvatham et al., 2014), y ambos marcadores tiñen los núcleos celulares (figura 18-2). Este último marcador también puede ser positivo en los tumores neuroendocrinos del timo, pero las reacciones de los tumores tímicos solo se observan cuando se usa el anticuerpo policlonal PAX8 (Toriyama et al., 2014).

Resumen de respuesta

Se pueden agregar anticuerpos policlonales PAX8 y p40/p63 al panel de queratina y TdT para la caracterización de los timomas.

¿Cómo puede ayudar la inmunohistoquímica en la clasificación de los timomas?

Las tinciones inmunohistoquímicas pueden mejorar la reproducibilidad de la clasificación del timoma tipo B de la OMS (figura 18-3). Los timomas B1 tienen una distribución en malla de las células positivas para queratina (figura 18-1B), mientras que los timomas B2 muestran racimos de células positivas para queratina.

Resumen de respuesta

La tinción de queratina puede revelar el patrón de las células epiteliales, lo que ayuda a la clasificación entre timomas B1 y B2.

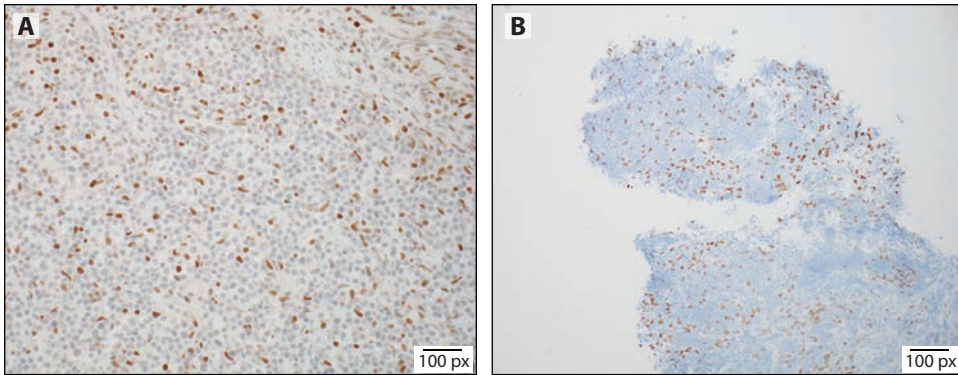


Figura 18-2. (A) La tinción inmunohistoquímica para PAX8 resalta las células epiteliales tímicas. (B) La tinción inmunohistoquímica para p40 resalta las células epiteliales tímicas en una biopsia por aguja gruesa de un timoma tipo B2.

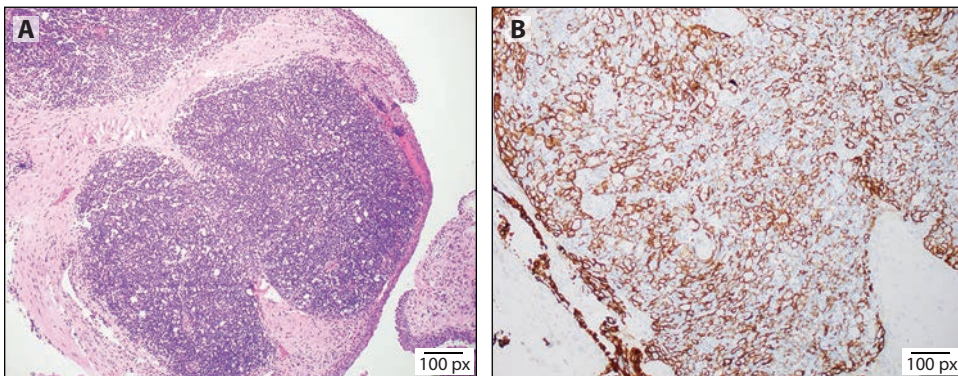


Figura 18-3. (A) Corte teñido con H&E de un timoma tipo B de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (B) La tinción inmunohistoquímica para queratina (AE1/AE3) muestra racimos de células epiteliales y completa así el criterio para la clasificación del timoma tipo B2. Compárese con la figura 18-1B que muestra una red tipo malla de células positivas para queratina en un timoma tipo B1.

¿Cómo se puede diferenciar el timoma del carcinoma tímico?

El diagnóstico diferencial entre un timoma B3 y un carcinoma tímico puede ser difícil, en especial en una biopsia pequeña. El diagnóstico se fundamenta en características morfológicas de las células tumorales, pero la inmunohistoquímica (IHQ) puede ayudar en el diagnóstico ([figura 18-4](#)). El timoma tipo B3 de la OMS se asocia con linfocitos TdT-positivos, mientras que el carcinoma tímico no se asocia con linfocitos tímicos, por lo que una tinción inmunohistoquímica para TdT o Cd1a es negativa en estos carcinomas (Weissferdt et al., 2016; Marx et al., 2014). La mayoría de los carcinomas tímicos son carcinomas de células escamosas; por ello, estos tumores son positivos para p40/p63 y PAX8. Aunque estos marcadores no son específicos, la reacción positiva indica un origen tímico. Además, entre el 60 % y el 70 % de los carcinomas tímicos expresan positividad para KIT (CD117) y CD5 en las células epiteliales, en contraste con la falta de reacción positiva dual para KIT y CD5 en el cáncer de pulmón. Estos cuatro marcadores pueden incrementar el rendimiento diagnóstico en términos de los diagnósticos diferenciales entre el carcinoma tímico, el timoma B3 y el carcinoma de células escamosas del pulmón (Asirvatham et al., 2014; Su et al., 2015; Kriegsmann et al., 2015).

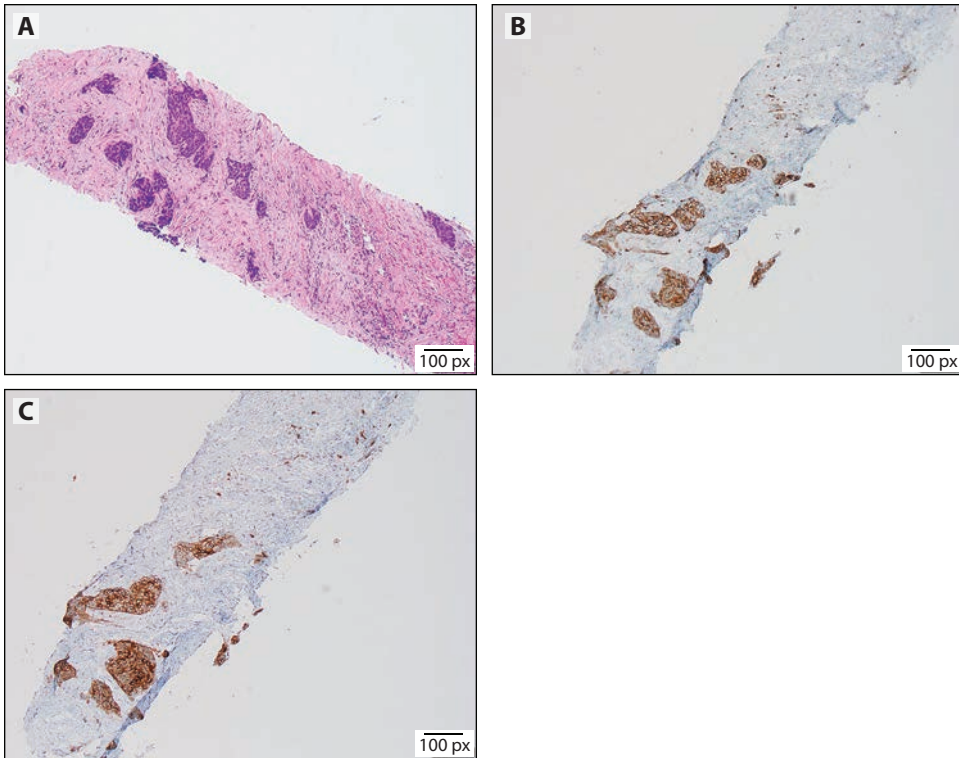


Figura 18-4. (A) Corte teñido con H&E de un carcinoma tímico en una biopsia por aguja gruesa que muestra racimos de células epiteliales en un estroma fibroso. Tinción inmunohistoquímica para (B) CD5 y (C) CD117, la cual muestra (B) una reacción positiva membranosa y citoplasmática en las células epiteliales. Las células tumorales epiteliales también fueron positivas para p40, y no hubo linfocitos TdT-positivos asociados con el tumor (*no se muestra en la imagen*).

Resumen de respuesta

El diagnóstico diferencial de la OMS entre el timoma tipo B3 y el carcinoma tímico puede ser difícil en muestras de biopsia pequeñas. La presencia de linfocitos TdT positivos respalda el diagnóstico del timoma. La expresión positiva de CD5 y/o CD117 es útil en el diagnóstico del carcinoma tímico, así como en el diagnóstico diferencial con el carcinoma de células escamosas de pulmón.

¿Qué tinciones son útiles para el diagnóstico de los tumores de células germinales?

El diagnóstico de los tumores de células germinales mediastinales se basa fundamentalmente en información clínica, radiográfica e histológica. Los tumores de células germinales son prevalentes en hombres adultos jóvenes (Calaminus y Joffe, 2016) y se asocian con un incremento en marcadores séricos como la α -fetoproteína (AFP), y la β -gonadotropina coriónica humana (β -HCG) para el tumor del saco vitelino y el coriocarcinoma, respectivamente (Salem y Gilligan, 2011), a pesar de no haber marcadores séricos para el seminoma, el teratoma o el carcinoma embrionario. Los componentes de un tumor de células germinales se pueden determinar mediante histología e IHQ debido a que cada tumor posee patrones de inmunoreactividad específicos, con excepción del teratoma, ya que no se han descrito marcadores específicos para este tumor. Para diferenciarlo de otros tumores, la proteína tipo Sal 4 (SALL4) se expresa con mayor amplitud en los tumores de células germinales ([figura 18-5](#)), incluyendo al teratoma. Aunque algunas leucemias linfoblásticas de células B y la leucemia mieloide aguda también son positivas, la expresión de SALL4 sugiere un diagnóstico de tumor de células germinales mediastinal. Desde el punto de vista clínico, es importante diferenciar entre el seminoma y los tumores de células germinales no

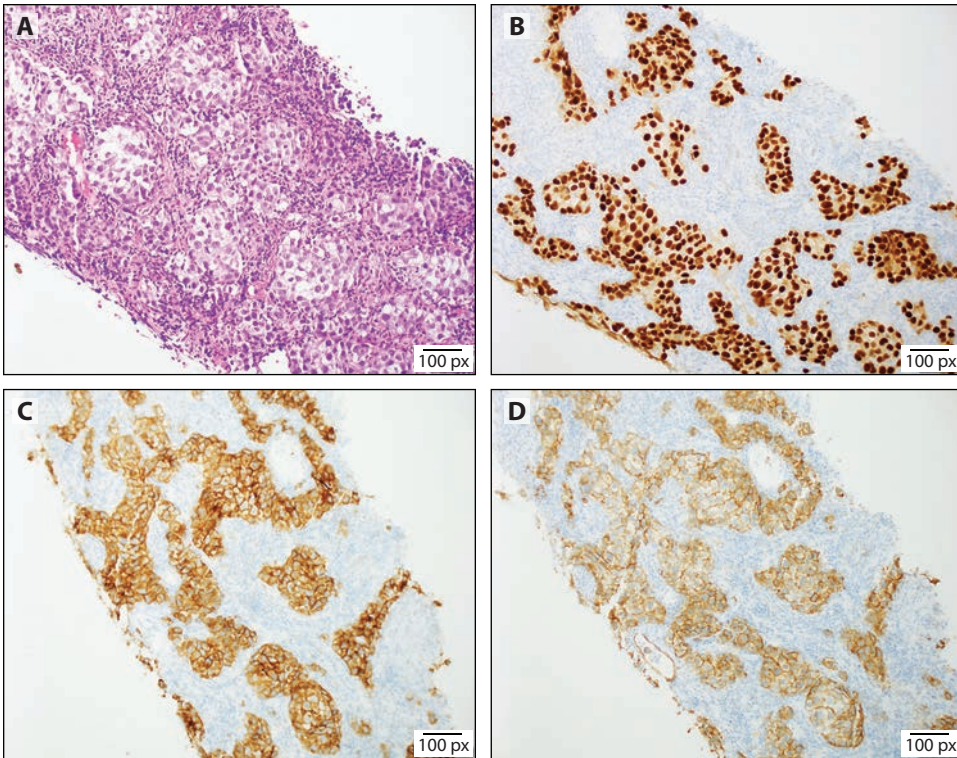


Figura 18-5. (A) Portaobjetos teñido con H&E de un seminoma mediastinal en una biopsia por aguja gruesa. Grupos de células tumorales grandes rodeados por linfocitos. (B) El seminoma es positivo para SALL4 (tinción nuclear), un marcador para todos los tumores de células germinales, OCT4 (*no se muestra en la imagen*), (C) CD117 y (D) D2-40.

seminomatosos; de este modo, para esta diferencia, OCT3/4, KIT (CD117), CD30 y el glicano 3 son los marcadores recomendados ([figura 18-5](#)) (Ulbright et al., 2014), por cuanto la mayoría de los tumores son tumores de células germinales mixtos y contienen cualquier combinación de tumores. OCT3/4 es positivo en el seminoma y en el carcinoma embrionario, pero es negativo en los tumores del saco vitelino ([figura 18-6](#)) y el coriocarcinoma. CD117 se expresa en casi todos los seminomas, pero es negativo en los carcinomas embrionarios y muestra expresión variable en los tumores del saco vitelino. CD30 es positivo en la mayoría de los carcinomas embrionarios ([figura 18-7](#)), pero es negativo en otros tumores de células germinales, mientras que el glicano 3 se observa en los tumores del saco vitelino y en la mayoría de los coriocarcinomas, pero casi siempre es negativo en los carcinomas embrionarios y en los seminomas. La mayoría de los tumores del saco vitelino son positivos para AFP, pero esto puede ser focal. Los coriocarcinomas también expresan HCG ([figura 18-8](#)) (Ulbright et al., 2014). En contraste con los tumores del testículo, los tumores de células germinales mediastinales pueden ser positivos para citoqueratina (Suster et al., 1998; Weissferdt et al., 2015), por lo que una queratina positiva no indica de forma inmediata un tumor epitelial ([figura 18-9](#)).

Resumen de respuesta

SALL4 es un marcador para todos los tumores de células germinales y se debe incluir en el panel de los análisis de estos tumores (Camparo y Comperat, 2013). Una vez que el SALL4 positivo sugiere un tumor de células germinales, se pueden usar OCT3/4, KIT (CD117), CD30 y glicano 3 como clasificadores para el seminoma y los tumores de células germinales no seminomatosos (Cheng et al., 2007; Weissferdt et al., 2019). Luego del examen histológico, se deben incluir y agregar otros marcadores según corresponda (Ulbright 2005; Weissferdt et al., 2015).

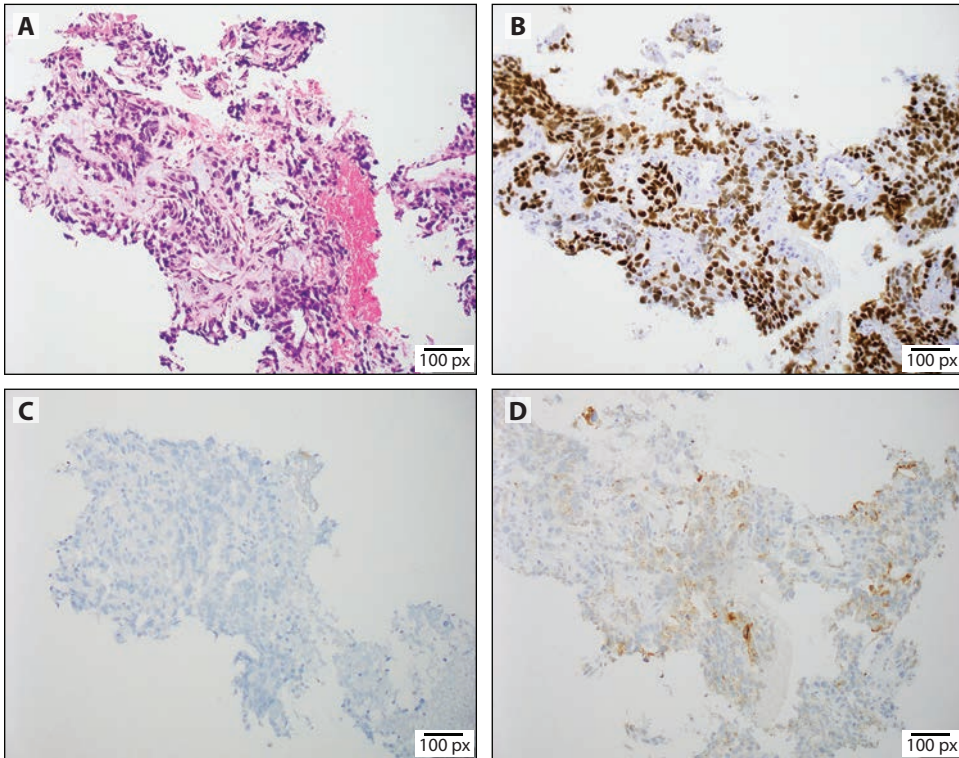


Figura 18-6. (A) Portaobjetos teñido con H&E de un tumor de saco vitelino mediastinal que forma patrones histológicos que se asemejan a estructuras embrionarias. Los tumores del saco vitelino son (B) positivos para SALL4 y (C) negativos para OCT4. Los tumores del saco vitelino también son (D) positivos para glipicano 3, a menudo con una distribución nodular. El tumor también es positivo para α -fetoproteína (AFP) (*no se muestra en la imagen*).

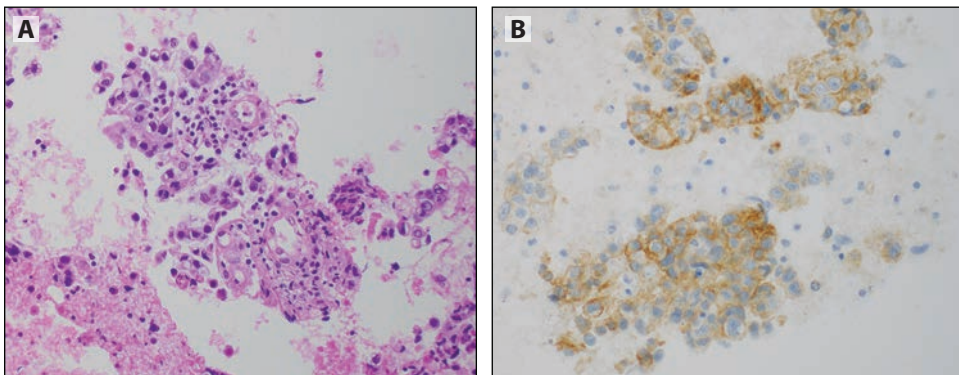


Figura 18-7. Portaobjetos teñidos con H&E de carcinoma embrionario en un bloque celular. (A) Las células tumorales son más grandes y pleomórficas que el tumor del saco vitelino. (B) Los carcinomas embrionarios son positivos para CD30. Las células tumorales también son positivas para SALL4 y OCT4 (*no se muestra en la imagen*).

Conclusiones

Los tumores tímicos son poco comunes e incluyen diversos subtipos histológicos. La IHQ proporciona una ayuda sustancial para el diagnóstico diferencial de los tumores tímicos, en particular en muestras de biopsia pequeñas. Además de los tumores epiteliales tímicos y los tumores de células germinales que se han discutido en este capítulo, en el timo también se pueden desarrollar linfomas, tumores neuroendocrinos y otros tumores poco frecuentes. En otra sección de este documento se describe el diagnóstico diferencial de estos tumores (Marx et al., 2015).

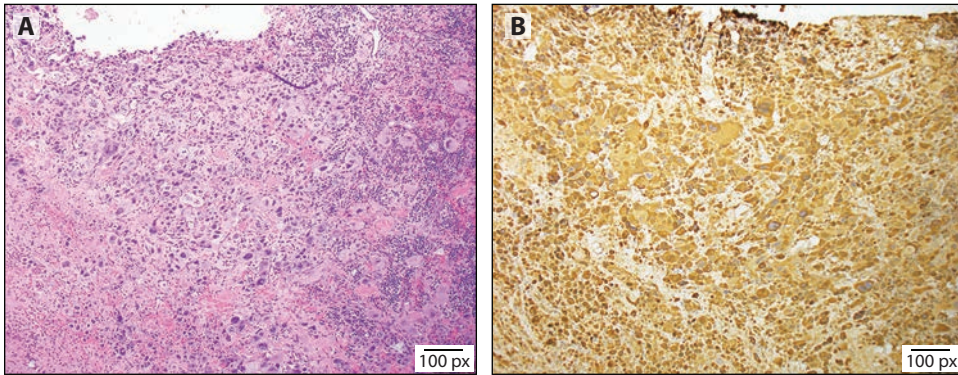


Figura 18-8. Portaobjetos teñido con H&E de un coriocarcinoma. (A) Células pleomórficas grandes y multinucleadas asociadas a menudo con hemorragia. (B) Los coriocarcinomas son positivos para β-gonadotropina coriónica humana (β-HCG), y a menudo son negativos para todos los otros marcadores de tumores de células germinales.

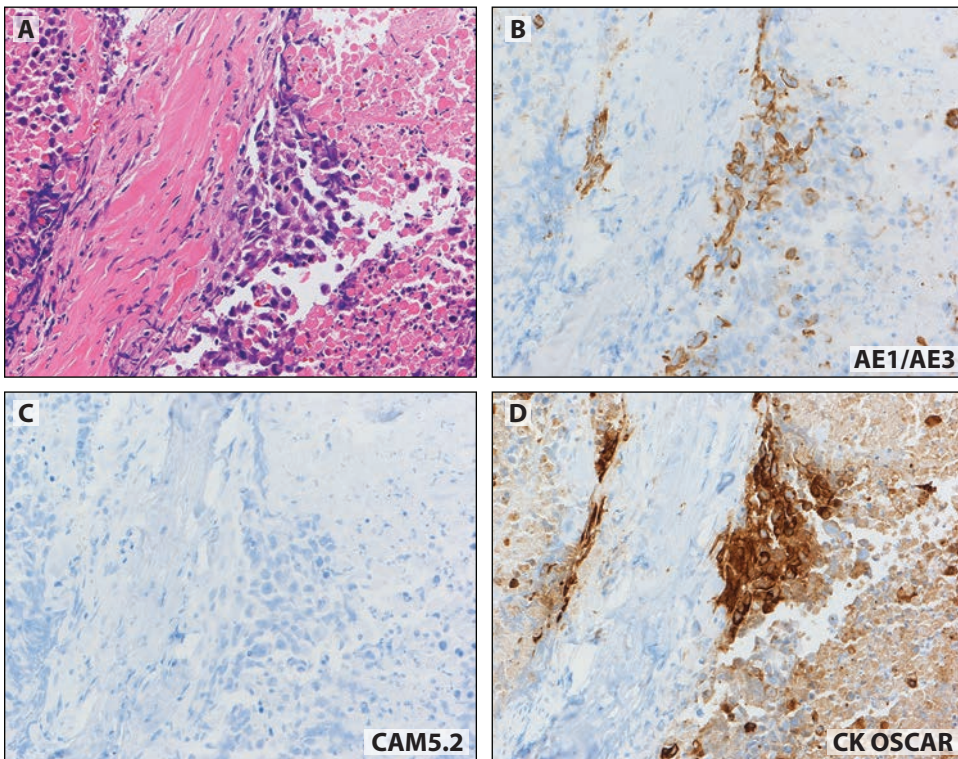


Figura 18-9. Tinción para citoqueratina en el seminoma. Puesto que el seminoma puede ser positivo para citoqueratina, la positividad no indica directamente un tumor epitelial.

Referencias

Araki T, Nishino M, Gao W, et al. Anterior mediastinal masses in the Framingham Heart Study: prevalence and CT image characteristics. *Eur J Radiol Open*. 2015;2:26-31.

Asirvatham JR, Esposito MJ, Bhuiya TA. Role of PAX-8, CD5, and CD117 in distinguishing thymic carcinoma from poorly differentiated lung

carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22:372-376.

Calaminus G, Joffe J. Germ cell tumors in adolescents and young adults. *Prog Tumor Res*. 2016;43:115-127.

Camparo P, Comperat EM. SALL4 is a useful marker in the diagnostic work-up of germ cell tumors in extra-testicular locations. *Virchows Arch*. 2013;462:337-341.

- Cheng L, Sung MT, Cossu-Rocca P, et al. OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia. *J Pathol.* 2007;211:1-9.
- Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol.* 2000;13:962-972.
- Kriegsmann M, Muley T, Harms A, et al. Differential diagnostic value of CD5 and CD117 expression in thoracic tumors: a large scale study of 1465 non-small cell lung cancer cases. *Diagn Pathol.* 2015;10:210.
- Marx A, Chan JK, Coindre JM, et al. The 2015 World Health Organization classification of tumors of the thymus: continuity and changes. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1383-1395.
- Marx A, Strobel P, Badve SS, et al. ITMIG consensus statement on the use of the WHO histological classification of thymoma and thymic carcinoma: refined definitions, histological criteria, and reporting. *J Thorac Oncol.* 2014;9(5):596-611.
- Ordonez NG. Value of PAX 8 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Adv Anat Pathol.* 2012;19:140-151.
- Pomplun S, Wotherspoon AC, Shah G, et al. Immunohistochemical markers in the differentiation of thymic and pulmonary neoplasms. *Histopathology.* 2002;40:152-158.
- Salem M, Gilligan T. Serum tumor markers and their utilization in the management of germ-cell tumors in adult males. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11:1-4.
- Siesling S, van der Zwan JM, Izarzugaza, I, et al. Rare thoracic cancers, including peritoneum mesothelioma. *Eur J Cancer.* 2012;48(7):949-960.
- Su XY, Wang WY, Li JN, et al. Immunohistochemical differentiation between type B3 thymomas and thymic squamous cell carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:5354-5362.
- Suster S, Moran CA, Dominguez-Malagon H et al. Germ cell tumors of the mediastinum and testis: a comparative immunohistochemical study of 120 cases. *Hum Pathol.* 1998;29(7):737-742.
- Toriyama A, Mori T, Sekine S, et al. Utility of PAX8 mouse monoclonal antibody in the diagnosis of thyroid, thymic, pleural and lung tumours: a comparison with polyclonal PAX8 antibody. *Histopathology.* 2014;65(4):465-472.
- Ulbright TM. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Mod Pathol.* 2005;18(suppl 2):S61-79.
- Ulbright TM, Tickoo SK, Berney DM, et al. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in testicular tumors: a report from the International Society of Urological Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):e50-59.
- Weissferdt A, Kalhor N, Moran CA. Thymomas with extensive clear cell component: a clinicopathologic and immunohistochemical study of nine cases. *Am J Clin Pathol.* 2016;146:132-136.
- Weissferdt A, Kalhor N, Rodriguez Canales J, et al. Primary mediastinal yolk sac tumors: an immunohistochemical analysis of 14 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2019;27:125-133.
- Weissferdt A, Rodriguez-Canales J, Liu H, et al. Primary mediastinal seminomas: a comprehensive immunohistochemical study with a focus on novel markers. *Hum Pathol.* 2015;46(3):376-383.

Uso de la inmunohistoquímica en las pruebas de biomarcadores predictivos

19

Por Keith M. Kerr, Ming Sound Tsao, Fred R. Hirsch e Ignacio I. Wistuba

Introducción

Como se ha discutido de manera extensa en otra parte de este libro, la inmunohistoquímica (IHQ) trata en su mayor parte de la detección de proteínas en cortes tisulares. Por el contrario, con unas pocas excepciones, las alteraciones oncogénicas celulares que hacen a los tumores susceptibles a los fármacos dirigidos molecularmente, con frecuencia se relacionan con alteraciones genéticas a nivel del ADN y/o ARN. No obstante, es la proteína alterada la que ejerce la actividad oncogénica, y es a esta proteína y no a la secuencia alterada de ácido nucleico a la que está dirigido el fármaco.

La introducción de la IHQ para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en las pruebas para el cáncer de mama fue un proceso difícil a inicios de los noventa, e hizo que muchos oncólogos desconfiaran de la IHQ en general. Algunos biomarcadores basados en IHQ en el carcinoma no microcítico (CNM) han surgido y desaparecido (enzima timidilato sintasa, receptor del factor de crecimiento epidérmico [EGFR] y MET), pero algunos de ellos pueden reaparecer (véanse las siguientes secciones). Sin embargo, hace poco, la IHQ para el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) ha establecido firmemente esta técnica en el centro de las pruebas de biomarcadores para el CNM.

¿La IHQ tiene una función en la detección de alteraciones del EGFR?

Las pruebas IHQ contra la proteína de tipo salvaje (WT) del EGFR se investigaron durante la búsqueda de biomarcadores, a fin de seleccionar pacientes para la terapia con inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) del EGFR, hasta que se descubrió un grupo más específico de pacientes con un rango de mutaciones activadoras y sensibilizadoras en el dominio TK del *EGFR* que se beneficiaron de estos fármacos (Clark et al., 2006; Eberhard et al., 2008). En el ensayo *FLEX*, la IHQ para WT del EGFR fue eficaz para seleccionar pacientes con más probabilidad de beneficiarse del anticuerpo monoclonal anti-EGFR, cetuximab (Douillard et al., 2014), pero no se pudo obtener la aprobación reguladora para este agente, por lo que las pruebas IHQ para WT del EGFR nunca alcanzaron la fase de práctica clínica de rutina. Este biomarcador también se usó en los ensayos del necitumumab, otra terapéutica de anticuerpo monoclonal anti-EGFR, pero se no pudo demostrar una selección eficaz de pacientes (Diaz-Serrano et al., 2019).

Se dispone de anticuerpos para uso en ensayos IHQ para detectar proteínas mutantes del L858R de la mutación L858R del exón 21 del *EGFR* y algunas de las proteínas mutantes de la delección del exón 19. Aunque la sensibilidad y especificidad de la proteína anti-L858R es aceptable, el rango de las mutaciones de delección del exón 19 encontradas en la práctica clínica hace que el anticuerpo sea incapaz de identificar todas las proteínas mutantes, debido a que solo detecta delecciones de 15 pares de bases y ninguna otra delección sensibilizante en el exón 19 (Cooper et al., 2013; Chen et al., 2014). Consecuentemente, la sensibilidad para todas las mutaciones de delección del exón 19 es baja y cae por debajo del nivel aceptable de rutina en la práctica clínica.

No obstante, estas pruebas IHQ se usan en la práctica clínica cuando no es posible realizar la prueba de secuencia de mutación, o cuando los tiempos de respuesta prolongados para estas pruebas de mutación exigen que esta prueba IHQ tenga un tiempo de respuesta de 1 a 2 días (figura 19-1). En la última versión de las guías sobre pruebas moleculares del *College of American Pathologists* (CAP), la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) y la *Association for Molecular Pathology* (AMP) no se recomienda este método de la prueba de mutación *EGFR* mediante IHQ para la práctica de rutina (Lindeman et al., 2018).

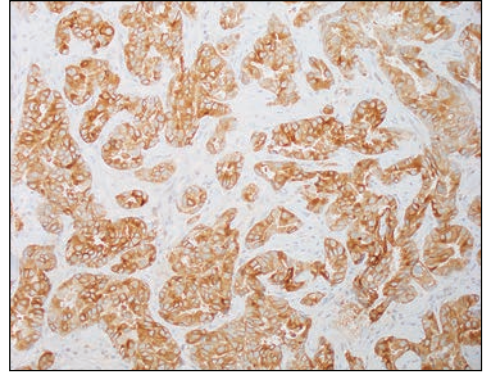


Figura 19-1. Adenocarcinoma metastásico de pulmón en una biopsia por aguja gruesa de mama en una mujer de 86 años. El tumor es positivo para la mutación de delección del exón 19 *EGFR* detectada por anticuerpo específico (E746_A750del- clon 6B6, Roche Tissue Diagnostics).

Respuesta de resumen

Actualmente, la IHQ del WT del *EGFR* no tiene un uso clínico recomendado de forma rutinaria. La IHQ para detectar una gama limitada de proteínas mutantes del *EGFR* se utiliza ocasionalmente en circunstancias particulares.

¿Cuál es el papel de la IHQ en la detección de tumores con reordenamientos del gen *ALK*?

La IHQ para la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) tiene una función fundamental en la detección del reordenamiento del gen *ALK* en pacientes. A veces se usa como una herramienta de cribado, pero también ha sido aceptada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) cuando la prueba *VENTANA ALK (D5F3) CDx* se usa para determinar la terapia sin una prueba directa real de un reordenamiento del gen *ALK* (Lindeman et al., 2018).

Hay una elevación modesta en la proteína *ALK* en el citoplasma de las células tumorales del CNM con reordenamiento del gen *ALK*. Excepto por algunos tejidos neurales, la proteína *ALK* no se encuentra en los tejidos normales de adulto (Hallberg y Palmer, 2013). Como resultado, se adoptó el cribado IHQ para *ALK* como un método rápido y económico para identificar pacientes con CNM cuyas muestras debían ser enviadas para hibridación fluorescente *in situ* (FISH) confirmatoria u otras pruebas moleculares. Esto le evita al laboratorio realizar un gran número de pruebas FISH costosas para identificar una anomalía molecular presente solo en alrededor del 4 % de la población de prueba. Los estudios que usaron el clon *ALK1*, que era de uso común para el diagnóstico del linfoma anaplásico cuando los niveles de proteína *ALK* eran altos, probaron ser inadecuadamente sensibles para detectar de manera confiable los niveles menores de proteína *ALK* encontrados en el CNM con reordenamiento del gen *ALK* (Mino-Kenudson et al., 2010). Se desarrollaron pruebas que usan los clones 5A4 y D5F3 anti-*ALK*, y varios estudios

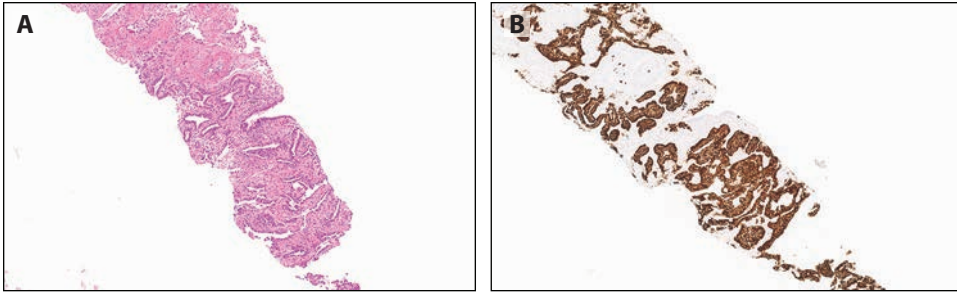


Figura 19-2. (A) Biopsia por aguja gruesa de pulmón que muestra un adenocarcinoma de patrón acinar. (B) Este tumor tiene un reordenamiento genético de quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) y fue claramente positivo en la inmunohistoquímica (IHQ) para *ALK* usando una prueba desarrollada en laboratorio basada en el clon 5A4.

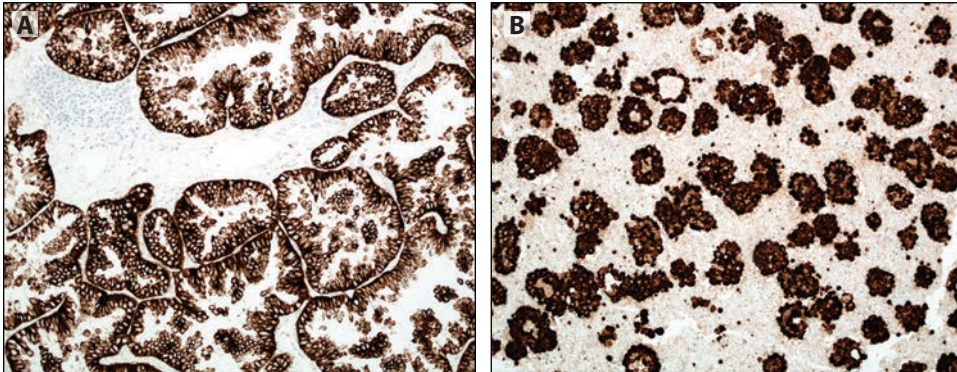


Figura 19-3. Adenocarcinoma de pulmón que muestra tinción fuerte y difusa para quinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) usando la prueba *VENTANA ALK (D5F3) CDx* en (A) una biopsia quirúrgica y (B) un bloque celular de derrame pleural. Ambos casos mostraron un reordenamiento del gen *ALK* en la prueba de hibridación fluorescente in situ (FISH).

han mostrado que estas pruebas se pueden usar para el cribado de poblaciones de muestras de CNM y la identificación de casos con el reordenamiento del gen *ALK* (figuras 19-2 y 19-3) (Tsao et al., 2016). Aunque la sensibilidad casi siempre es adecuada, dependiendo de la química de detección de cualquier prueba desarrollada en laboratorio (LDT) particular, la especificidad es menor, en especial cuando la positividad IHQ se observa a niveles menores (Tsao et al., 2013; Blackhall et al., 2014; von Laffert et al., 2014; Minca et al., 2013; Selinger et al., 2013; Nitta et al., 2013). Por esta razón, dichas pruebas se usan mejor como herramientas de cribado para seleccionar pacientes para FISH u otras pruebas moleculares confirmatorias (Lindeman et al., 2018). No obstante, los equipos de atención del cáncer validan su propia prueba IHQ LDT para *ALK* y, si tiene una especificidad aceptablemente elevada y las autoridades reguladoras relevantes lo permiten, pueden elegir usarla directamente para tomar decisiones sobre la terapia. Sin embargo, hay que resaltar que el rendimiento de las pruebas LDT de la *ALK*, en algunos esquemas externos de aseguramiento de la calidad, no alcanza un nivel aceptable (Ibrahim et al., 2016). La prueba *VENTANA ALK (D5F3) CDx* es una prueba altamente sensible y específica que está aprobada para la selección del tratamiento de TKI de *ALK* en pacientes con CNM en estadio avanzado. Esta prueba utiliza un paso de amplificación de tiramida en el sistema de detección, la cual elimina el rango dinámico de tinción en las muestras de CNM con reordenamiento de *ALK* y crea una lectura en efecto binaria: positiva o negativa. La prueba *VENTANA ALK (D5F3)* demuestra una alta correlación con la presencia de un reordenamiento del gen *ALK* en el CNM (Nitta et al., 2013).

En un giro interesante en la historia de las pruebas para el reordenamiento *ALK* en el CNM, ahora existe evidencia tanto de estudios académicos como del ensayo *ALEX*, el cual

indica que los pacientes cuyos tumores tienen un reordenamiento del gen *ALK* y son positivos para la IHQ, muestran mayores tasas de respuesta que aquellos pacientes con tumores positivos para reordenamiento pero con negatividad en la IHQ (van der Wekken et al., 2017; Mok et al., 2017). Esto tiene sentido ya que la proteína es la porción oncogénica y es el objetivo del fármaco. También señala que la IHQ de la *ALK* tiene una función importante en pacientes cuyo reordenamiento del gen *ALK* se detecta por secuenciación de nueva generación (NGS) (véase “Conclusiones”).

Por último, una advertencia cuando se usa IHQ para *ALK* sin FISH o confirmación molecular, como se acaba de describir. Aproximadamente hasta el 20 % de los carcinomas neuroendocrinos de pulmón de alto grado expresan, una positividad IHQ para *ALK*, a veces fuerte y difusa, en ausencia de un reordenamiento genético (figura 19-4). En ocasiones, dichos tumores se pueden diagnosticar erróneamente como un adenocarcinoma con base en la positividad IHQ para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1), en especial en muestras pequeñas y con desafíos morfológicos (Kondoh et al., 2019).

Respuesta de resumen

La IHQ de *ALK* tiene una función fundamental en las pruebas de biomarcadores predictivos de *ALK* en pacientes con CNM en estadio avanzado.

¿Cuál es la función de la IHQ en la detección de tumores con reordenamientos del gen *ROS1*?

En comparación con las pruebas para *ALK*, la prueba para el reordenamiento del oncogén 1 c-ros (*ROS1*) es menos madura. No se dispone de una prueba IHQ diagnóstica acompañante para *ROS1* y, aunque el uso de la IHQ para *ROS1* está bien establecido y recomendado, esta metodología solo se debe usar como herramienta de cribado para enriquecer una población de prueba para FISH o para pruebas moleculares de detección de reordenamientos del gen *ROS1* (Lindeman et al. 2018., Tsao et al., 2016). Por lo tanto, por definición, todas las pruebas IHQ para *ROS1* actualmente en uso son LDT. En la práctica clínica se usa con frecuencia el clon D4D6. Los datos publicados sugieren que es posible desarrollar una prueba adecuadamente sensible (figura 19-5), pero la especificidad casi siempre es menor que la de las mejores pruebas IHQ para *ALK* (Bubendorf et al., 2016; Selinger et al., 2017). Los niveles de proteína *ROS1* pueden ser variables en diferentes partes de un tumor portador de un reordenamiento, lo que abre la posibilidad para errores de muestreo de la biopsia, y la expresión puede ser muy baja en presencia de ciertos reordenamientos, lo que podría impedir que se detecten algunos genes de fusión por medio del

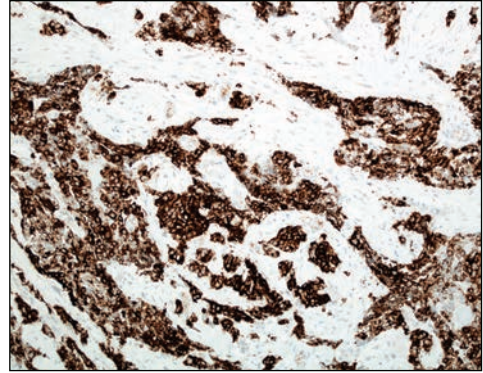


Figura 19-4. Muestra de biopsia endobronquial que exhibe positividad para carcinoma microcítico usando la prueba VENTANA *ALK (D5F3) CDx*. No hubo reordenamiento en la prueba de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

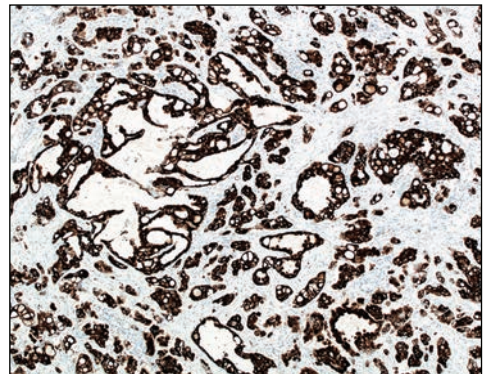


Figura 19-5. Tinción difusa en adenocarcinoma de pulmón para el oncogén 1 c-ros (*ROS1*) utilizando una prueba basada en D4D6. Este caso mostró un reordenamiento del gen *ROS1* en la prueba de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

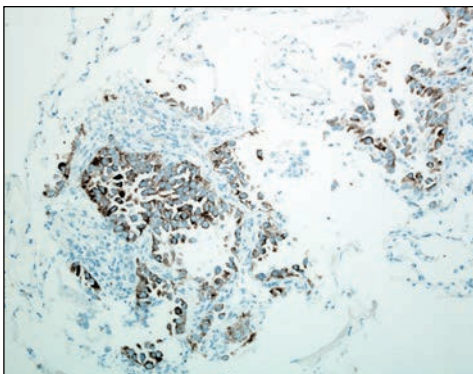


Figura 19-6. Esta biopsia de pulmón por aguja gruesa muestra un adenocarcinoma con tinción positiva para oncogén 1 c-ros (*ROS1*) utilizando una prueba basada en D4D6. No hubo reordenamiento genético en la prueba de hibridación fluorescente in situ (FISH).

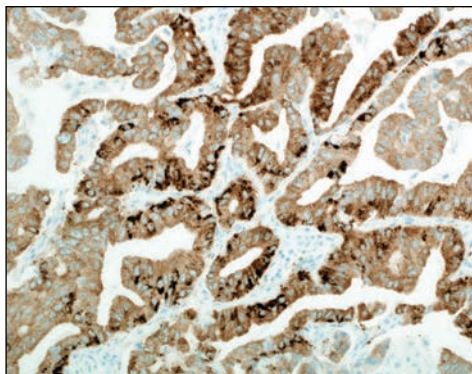


Figura 19-7. Adenocarcinoma de pulmón con reordenamiento genético del oncogén 1 c-ros (*ROS1*) y tinción positiva para *ROS1* usando el clon SP384. Este caso demuestra muy bien la variabilidad en la intensidad y el carácter granular de la tinción observado a menudo en estos casos.

cribado de IHQ. Por el contrario, algunos adenocarcinomas pueden mostrar una positividad focal moderada a fuerte en ausencia de una fusión *ROS1* (figura 19-6). Los datos han mostrado que los reordenamientos del gen *ROS1* se pueden encontrar a niveles tan bajos como del 20 % en casos positivos para IHQ de *ROS1* (Tsao et al., 2016). Recientemente, se ha comenzado a utilizar el clon SP384 anti-*ROS1* (Roche Tissue Diagnostics), que también es una herramienta de cribado eficaz (figura 19-7) (Huang et al., 2019; Conde et al., 2019; Hofman et al., 2019).

Hasta ahora no hay datos que muestren una relación entre la respuesta a la terapia y la positividad IHQ en este contexto, pero ciertamente amerita estudio.

Respuesta de resumen

La IHQ del *ROS1* es una técnica establecida para el enriquecimiento de una población de pacientes con CPNM en estadio avanzado para que se confirme el reordenamiento del gen *ROS1* mediante un método molecular alternativo.

¿La IHQ tiene un papel en la identificación de tumores con reordenamientos del gen *NTRK1-3*?

Cuando se compara con las alteraciones precedentes, hay incluso menos experiencia en los casos de CNM con las pruebas para genes de fusión del receptor de tirosina quinasa neurotrópico (*NTRK*) pero, una vez más, ha surgido el paradigma de cribado para positividad IHQ. Este es especialmente el caso puesto que los reordenamientos *NTRK* son muy poco comunes en el CNM (del 0,1 % al 1 %) (Farago et al., 2018) y, por ejemplo, para muchos laboratorios no sería factible cribar todos los casos relevantes con una prueba FISH independiente. Los datos son limitados, pero la IHQ pan-TRK con el uso del clon EPR17341 (figura 19-8) (Abcam) ha mostrado una correlación con la presencia de reordenamientos del gen *NTRK1-3* encontrados por otros medios, y representa una estrategia de cribado factible (Hechtman et al., 2017). Aún se están desarrollando métodos para abordar esta difícil área de las pruebas de biomarcadores del CNM, pero se han publicado algunas recomendaciones (Penault-Llorca et al., 2019; Marchio et al., 2019). También puede haber positividad IHQ para *NTRK* en tumores neuroendocrinos cuando no hay un reordenamiento genético (figura 19-9) (K.M. Kerr, observación personal).

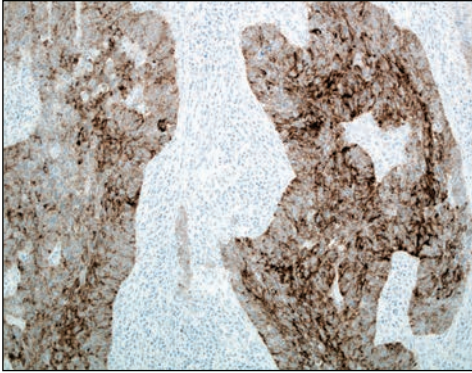


Figura 19-8. Adenocarcinoma de pulmón que muestra tinción positiva mediante inmunohistoquímica pan-TRK.

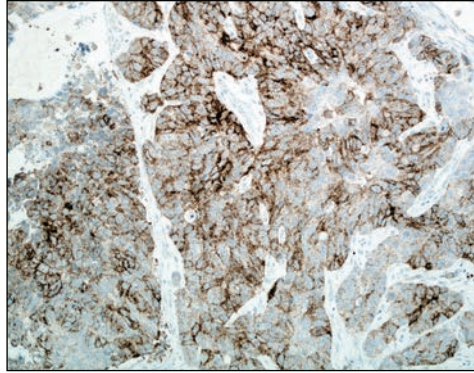


Figura 19-9. Carcinoma neuroendocrino de células grandes del pulmón que muestra positividad para inmunohistoquímica (IHC) pan-TRK, pero sin dato de reordenamiento del gen (*NTRK*) del receptor de tirosina quinasa neurotrópico.

Respuesta de resumen

La prueba IHQ para ayudar a la detección de reordenamientos del gen *NTRK1-3* es una técnica emergente, pero sin una función establecida.

¿Las pruebas IHQ tienen alguna función en las pruebas de biomarcadores predictivos para cualquier otra alteración genómica susceptible de responder al tratamiento?

Los inhibidores de la proteína del protooncogén B-raf (BRAF) y de la MEK quinasa están aprobados en muchos países para uso en pacientes con mutaciones BRAF V600E (Planchard et al., 2017; Planchard y Johnson, 2018; Leonetti et al., 2018). La metodología aprobada para la identificación de pacientes para esta terapia es alguna forma de secuenciación. Se dispone de anticuerpos para uso en pruebas IHQ para la identificación de la proteína mutante V600E. Aunque en ocasiones se usan en pacientes con melanoma maligno, no se recomienda su uso en pacientes con CNM (Lindeman et al., 2018).

Las pruebas IHQ para MET se introdujeron como un presunto biomarcador selectivo para uso con la terapia de anticuerpo monoclonal anti-MET, onartuzumab (Spigel et al., 2017). Aunque los niveles elevados de expresión de MET, que se evidenciaron en una prueba basada en el clon SP44, parecieron enriquecer los resultados favorables en pacientes, esta terapia no pudo alcanzar la aprobación reguladora. Recientemente, las alteraciones MET en el CNM pasaron a ser objetivos farmacológicos de interés en dos contextos particulares: la amplificación por primera vez del gen MET, o quizá más importante aún, en el contexto de un mecanismo de resistencia de recidiva luego de la terapia con TKI de EGFR como biomarcador para la terapia dirigida a MET (Salgia, 2017; Wang et al., 2019). Dichos tratamientos también están siendo investigados en pacientes cuyos tumores portan un amplio rango de mutaciones en y alrededor del exón 14 del gen MET, y en alteraciones que causan la omisión del exón 14 durante la transcripción y el estímulo oncogénico debido al deterioro en la degradación de la proteína MET (Salgia, 2017; Paik et al., 2015). En ambos escenarios, pero aún más en el caso de la omisión del exón 14 de MET, se ha analizado que los niveles elevados de proteína podrían ser un marcador IHQ que se podría usar para el cribado de tumores para pruebas moleculares dirigidas al MET. Hasta la fecha, la bibliografía parece sugerir que, aunque la IHQ positiva para MET se asocia con la presencia de cambios genómicos, los abordajes IHQ investigados hasta ahora no son lo suficientemente sensibles y específicos como para usarlos como herramientas de cribado, y muchos casos no serían detectados (Baldacci et al., 2020; Guo et al., 2019). En este contexto, el futuro de la IHQ para MET en el CNM es incierto.

Aunque la IHQ para HER2 está bien establecida como una prueba diagnóstica predictiva en el cáncer de mama, actualmente no tiene una función aprobada en las pruebas para el cáncer de pulmón. Las mutaciones HER2 son poco comunes en el cáncer de pulmón, pero la sobreexpresión de proteínas es más común. Datos recientes han hecho surgir la posibilidad de una terapia dirigida eficaz para estos grupos de pacientes (Smit et al., 2020). Aun cuando la IHQ del HER2 no es parte del escenario actual de pruebas, esto podría cambiar en el futuro.

Los reordenamientos genéticos del protooncogén *ret* (*RET*) son un objetivo prometedor, aunque poco común, en el cáncer de pulmón, debido a varios agentes nuevos que son eficaces contra el CNM con esta alteración. Siguiendo el paradigma ya descrito para las pruebas de ALK, ROS1 y NTRK, la IHQ del *RET* es de interés y valor probable, aunque actualmente no se dispone de datos.

Los reordenamientos del gen *NRG1* se encuentran en casos de CNM, en especial en adenocarcinomas mucinosos invasivos, y la terapia con TKI de EGFR ha mostrado una eficacia prometedora. En estos casos se ha descrito una IHQ positiva para la proteína *NRG1*, pero todavía se debe establecer la función de dicha prueba (Nagasaka y Ou, 2019; Trombetta et al., 2018).

En el carcinoma microcítico, la prueba IHQ para *DLL3* se estudió recientemente como una estrategia de enriquecimiento del conjugado anticuerpo-fármaco citotóxico rovalpituzumab tesirine (Morgensztern et al., 2019). Este fármaco no se está desarrollando actualmente en búsqueda de una aprobación reguladora debido a sus decepcionantes resultados obtenidos en los ensayos y a su considerable toxicidad (Morgensztern et al., 2019; Mullard, 2019).

Respuesta de resumen

No hay ninguna función establecida de las pruebas IHQ para la identificación de pacientes portadores de otras alteraciones susceptibles de responder al tratamiento.

¿Cuál es la función de la IHQ del PD-L1 en la selección de pacientes con CNM para la inmunoterapia?

La IHQ para PD-L1 está bien establecida en el algoritmo rutinario de pruebas de biomarcadores para el CNM en estadios III y IV. Este tema se ha analizado extensamente en otros estudios, incluido el *Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer* de la IASLC (Tsao et al., 2017). Aquí solo se presenta una breve revisión de algunos puntos clave.

La expresión IHQ de PD-L1 ha mostrado de manera consistente la capacidad de enriquecer poblaciones de pacientes con CNM que se benefician de fármacos anti-proteína 1 de muerte celular programada (PD1) o PD-L1. Mientras mayor sea la proporción de células tumorales que expresan PD-L1 en las membranas celulares a cualquier nivel de intensidad, mayor será la probabilidad de un beneficio para el paciente ([figura 19-10](#)). El biomarcador IHQ PD-L1 para la mayoría de los fármacos investigados en pacientes con CNM tiene que ver con la expresión solo en células tumorales, pero el atezolizumab se ha desarrollado con una prueba para PD-L1 basada en el clon SP142 y la expresión de PD-L1, tanto en el tumor como en las células inmunes ([figura 19-11](#)) (Fehrenbacher et al., 2016).

Aunque la relación dosis-respuesta se conserva entre los niveles de expresión de PD-L1 y los resultados clínicos en los ensayos clínicos de inmunoterapia de segunda línea o mayor, solo una prescripción de pembrolizumab requiere una puntuación de proporción tumoral (TPS) del PD-L1 mayor o igual al 1 % en este contexto (Herbst et al., 2016). Se pueden administrar otros inhibidores aprobados sin importar la expresión de PD-L1; las pruebas en esta situación se consideran complementarias (Brahmer et al., 2015; Borghaei et al., 2015; Fehrenbacher et al., 2016). Se requiere una TPS de la IHQ de PD-L1 del 50 %, o más, para el uso de la monoterapia de primera línea con pembrolizumab, y las pruebas 22C3 y SP263 (véase los próximos párrafos)

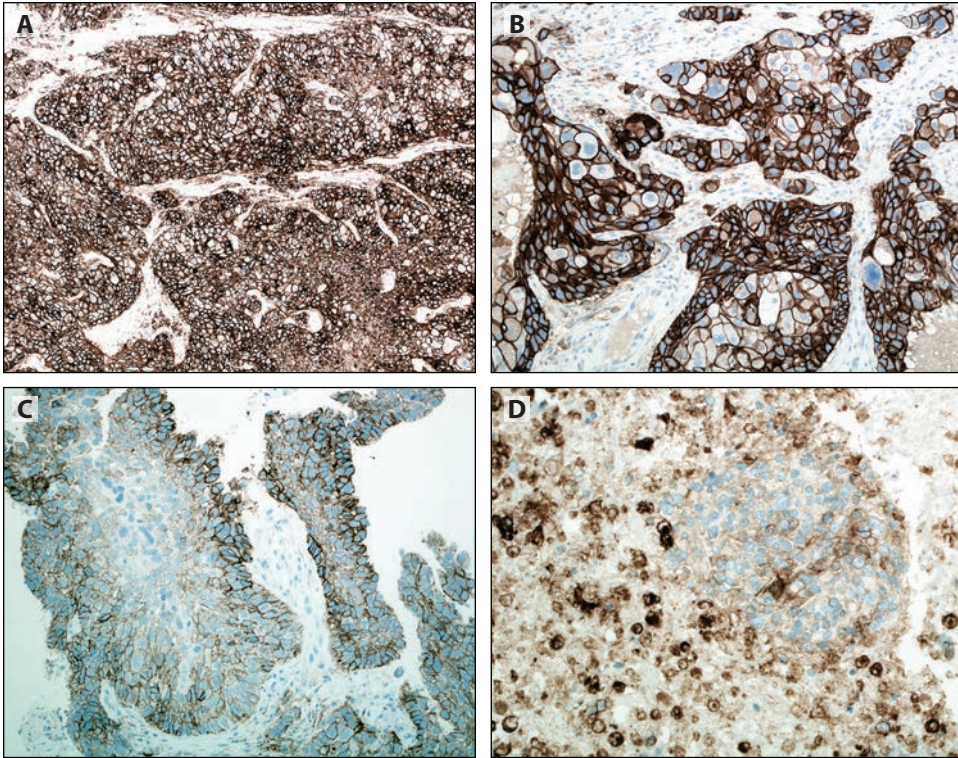


Figura 19-10. (A y B) Adenocarcinoma poco diferenciado que muestra una positividad de membrana fuerte y generalizada para el ligando 1 de muerte programada (PD-L1). **(C)** Carcinoma de células escamosas que muestra un patrón característico de tinción variable de la membrana celular tumoral. Carcinoma pulmonar no microcítico (CNM) metastásico en un bloque celular de citología por ecografía endobronquial (EBUS) que muestra una tinción muy focal de las células tumorales, pero también **(D)** tinción en macrófagos y restos celulares. Tinción usando la prueba Dako 22C3 pharmDx.

están aprobadas como diagnósticos complementarios en este contexto (Reck et al., 2016; prueba *VENTANA PD-L1 [SP263]*). Las combinaciones de primera línea de pembrolizumab y quimioterapia de doblete de platino tienen aprobación reguladora sin importar la expresión de PD-L1, a pesar de diferencias sustanciales en el resultado, dependiendo de la TPS de la IHQ del PD-L1; por lo general, la prueba diagnóstica se considera como un complemento útil en el caso de terapéuticas diferenciadas para determinados pacientes (Mok et al., 2019; Peters et al., 2019b). En el CNM de estadio III, el durvalumab, un inhibidor de PD-L1, está aprobado para su uso luego de la quimiorradioterapia. En los Estados Unidos, esta aprobación es independiente de la expresión de PD-L1, aunque TPS mayores de PD-L1 se correlacionan con una mayor probabilidad de beneficio (Antonia et al., 2017, 2018). En Europa, un análisis *post hoc* controversial de los datos del ensayo *Pacific* no mostró beneficios para la supervivencia global en menos del 1 % de la cohorte de la TPS, por lo que la Agencia Europea de Medicamentos impuso pruebas IHQ para PD-L1 y una TPS del 1 % o más para uso del régimen *Pacific* (Peters et al., 2019a).

Los 5 fármacos anti-PD1 o PD-L1 que se encuentran en las etapas más avanzadas de desarrollo, incluyendo las indicaciones aprobadas mencionadas con anterioridad, son pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, atezolizumab y avelumab. Cada uno de ellos ha sido desarrollado mediante ensayos clínicos con pruebas IHQ para PD-L1 utilizando los clones IHQ anti-PD-L1 22C3, 28-8, SP263, SP142 y 73-10, respectivamente. La multiplicidad de las diferentes pruebas para PD-L1 ha ocasionado cierta confusión entre los oncólogos y consternación en la patología. El principal dilema para la patología ha sido la interrogante de cuáles

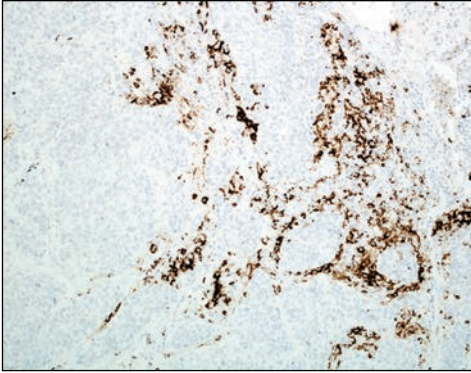


Figura 19-11. Tinción definida y marcada del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en células inmunes estromales que rodean a un adenocarcinoma de pulmón de patrón sólido, el cual no muestra positividad de las células tumorales. Tinción usando la prueba *VENTANA PD-L1 (SP142)*.

pruebas realizar. La mayoría de los laboratorios no puede ofrecer de manera razonable todas estas pruebas, por lo que lo ideal sería determinar si se puede hacer una sola prueba y si los resultados se pueden usar para todas las indicaciones clínicas precedentes. ¿Qué tan similares son estas pruebas validadas por ensayos? Varios estudios comparativos de pruebas, incluido el estudio *BluePrint* de la IASLC, han demostrado una concordancia aceptable entre las pruebas *22C3*, *28-8*, y *VENTANA PD-L1 (SP263)* para la evaluación de la TPS del CNM (Hirsch et al., 2017; Scheel et al., 2016; Ratcliffe et al., 2017; Hendry et al., 2018; Adam et al., 2018; Tsao et al., 2018; Rimm et al., 2017; Torlakovic et al., 2020). La prueba *VENTANA PD-L1 (SP142)* ha mostrado de manera consistente menores puntuaciones TPS,

mientras que la prueba *73-10* es significativamente más sensible; en las pruebas de avelumab, una TPS del 80 % se ha considerado equivalente a una puntuación del 50 % usando la prueba *22C3* (Barlesi et al., 2018). Hay algunos datos emergentes que sugieren que la prueba *VENTANA PD-L1 (SP263)* puede ser más sensible que la prueba *22C3*, aunque todavía no está claro el grado y la significancia de esto (Hendry et al., 2018; Munari et al., 2018).

Algunos laboratorios usarán su propia prueba LDT para PD-L1, en vez de una prueba comercial validada por ensayo. Aunque estas LDT pueden equiparar el rendimiento técnico de una prueba validada por ensayo (Adam et al., 2018; Neuman et al., 2016; Roge et al., 2017), no hay garantía de que lo harán, y se requiere una rigurosa validación de garantía de calidad interna y externa (Cheung et al., 2019).

No se usaron muestras tipo citología en ninguno de los ensayos clínicos antes mencionados o durante el desarrollo de la prueba comercial. Por lo tanto, ha existido resistencia a la utilización de material tipo citología para las pruebas clínicas de PD-L1. Sin embargo, ahora existe bibliografía sustancial que demuestra un rendimiento equivalente aceptable de la evaluación de PD-L1 para la TPS con pruebas validadas por ensayo, donde se compara la citología con las muestras de biopsia tisular del mismo tumor (Heymann et al., 2017; Buttner et al., 2017; Skov y Skov, 2017; Gosney et al., 2020; Yatabe et al., 2019). Tal es la variabilidad en la forma en que las muestras tipo citología se fijan, se procesan y se preparan para tinción, que se requiere una atención cuidadosa a estos pasos preanalíticos, y la estandarización ayudará a traducir estas observaciones de estudio en la práctica clínica de rutina. Se recomienda que los laboratorios que usan muestras tipo citología para las pruebas clínicas de PD-L1 emprendan la validación interna de sus procedimientos de laboratorio para garantizar un desempeño equivalente.

Respuesta de resumen

Aunque se están buscando activamente biomarcadores alternativos para su uso con la inmunoterapia en el CNM, parece muy probable que la IHQ del PD-L1 siga formando parte de la evaluación necesaria de las muestras clínicas de CNM en relación con la inmunoterapia anti-PD1 y PD-L1. Sin embargo, aún existen interrogantes sobre las diferentes pruebas, los tipos de muestras, la expresión en el tumor en comparación con los inmunocitos y cómo se deben utilizar los datos de IHQ para la toma de decisiones clínicas.

¿Se puede utilizar la IHQ para evaluar el microentorno tumoral con el fin de seleccionar a los pacientes para la inmunoterapia?

La IHQ puede tener una función potencial en la evaluación del grado de inflamación tumoral a nivel celular, o la evaluación de otras moléculas reguladoras que podrían implicar susceptibilidad o resistencia a las inmunoterapias actuales en el CNM. Sin embargo, hay relativamente pocos datos y todos aún son experimentales, puesto que ninguno de estos factores ha sido aceptado como terapia aprobada. Se ha usado IHQ para CD8 a fin de evaluar la inflamación tumoral (Conde et al., 2018), y la IHQ multiplexada se está explorando como una forma de evaluar múltiples factores celulares de manera simultánea en la misma muestra tumoral (Lu et al., 2019).

Respuesta de resumen

Queda por determinar cómo se podrían evaluar y utilizar en el futuro los factores del microentorno tumoral. Esto debe estar basado en pruebas sólidas y en ensayos clínicos.

Conclusiones

La IHQ es una herramienta relativamente simple, económica y poderosa para investigar de forma directa el estado de las proteínas, a menudo las fracciones oncogénicas y las dianas farmacológicas en muestras clínicas de CNM. La revolución molecular en la terapia personalizada contra el CNM se ha concentrado sobre todo en las alteraciones genómicas, y la plétora de datos mutacionales y de otros datos genómicos es científicamente tentadora y persuasiva. No obstante, la discusión precedente muestra con claridad que las evaluaciones proteómicas con IHQ aún tienen una función fundamental en el diagnóstico del CNM para garantizar que los pacientes reciban la terapia más eficaz. A medida que el número de biomarcadores clínicamente relevantes en los tumores de nuestros pacientes con CNM aumenta, así lo hace también la atracción que representa el uso de NGS paralela y multiplexada como un “punto único” de información de biomarcadores genómicos, mutaciones, genes de fusión e incluso número de copias de genes. A medida que la NGS se convierte en la plataforma estándar de pruebas moleculares, ¿podría disminuir o desaparecer el uso de la IHQ tal y como se acaba de describir? La práctica contemporánea en ciertos centros lo sugiere así, pero ¿qué hay de los datos sobre la importancia de la expresión proteica asociada con el reordenamiento del gen *ALK*? ¿Puede emerger un paradigma por medio del cual un gen de fusión detectado con NGS requerirá la demostración de la proteína para predecir mejor la eficacia del fármaco? Esta es una pregunta pertinente y lógica. Queda por ver si los ensayos patrocinados por la comunidad farmacológica o la comunidad científica proporcionarán los datos que nos den una respuesta.

Referencias

- Adam J, Le Stang N, Rouquette I, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(4):953-958.
- Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(20):1919-1929.
- Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2342-2350.
- Baldacci S, Figeac M, Antoine M, et al. High MET overexpression does not predict the presence of MET exon 14 splice mutations in MSCLC: results from the IFCT PREDICT.amm study. *J Thorac Oncol*. 2020;15(1):120-124.
- Barlesi F, Vansteenkiste J, Spigel D, et al. Avelumab versus docetaxel in patients with platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer (JAVELIN Lung 200): an open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(11):1468-1479.
- Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, et al. Prevalence and clinical outcomes from patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2780-2878.
- Borghaei H, Ares-Paz L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.

- Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-135.
- Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS1 in non-small lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch*. 2016;469(5):489-503.
- Buttner R, Gosney JR, Skov BG, et al. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry testing: a review of analytical assays and clinical implementation in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(34):3867-3876.
- Chen Z, Liu HB, Yu CH, et al. Diagnostic value of mutation-specific antibodies for immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(9):e105940.
- Cheung CC, Lim HJ, Garatt J, et al. Diagnostic accuracy in fit-for-purpose PD-L1 testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(4):251-257.
- Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL et al. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. *J Thorac Oncol*. 2006;1(8):837-846.
- Conde E, Caminoa A, Dominguez C, et al. Aligning digital CD8+ scoring and targeted next-generation sequencing with programmed death ligand 1 expression: a pragmatic approach in early-stage squamous cell lung carcinoma. *Histopathology*. 2018;72(2):270-284.
- Conde E, Hernandez S, Martinez R, et al. Assessment of a new ROS1 immunohistochemistry clone (SP384) for the identification of ROS1 rearrangements in patients with non-small cell lung carcinoma: the ROSING Study. *J Thorac Oncol*. 2019;14(12):2120-2132.
- Cooper WA, Yu B, Yip PY, et al. EGFR mutant-specific immunohistochemistry has high specificity and sensitivity for detecting targeted activating EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2013;66(9):744-748.
- Diaz-Serrano A, Sanchez-Torre A, Paz-Ares L. Nectinmab for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*. 2019;15(7):705-716.
- Douillard JY, Pirker R, O'Byrne KJ, et al. Relationship between EGFR expression, EGFR mutation status, and the efficacy of chemotherapy plus cetuximab in FLEX study patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;9(5):717-724.
- Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, et al. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization in the clinical trial setting. *J Clin Oncol*. 2008;26(6):983-994.
- Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer harbouring an NTRK gene fusion. *JCO Precis Oncol*. 2018. doi:10.1200/PO.18.00037
- Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomized controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10030):1837-1846.
- Gosney JR, Boothman AM, Ratcliffe M, et al. Cytology for PD-L1 testing: a systematic review. *Lung Cancer*. 2020;141:101-106.
- Guo R, Berry LD, Aisner DL, et al. MET IHC is a poor screen for MET amplification of MET exon 14 mutations in lung adenocarcinomas: data from tri-institutional cohort of the Lung Cancer Mutation Consortium. *J Thorac Oncol*. 2019;14(9):1666-1671.
- Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):685-700.
- Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan-TRK immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1547-1551.
- Hendry S, Byrne DJ, Wright GM, et al. Comparison of four PD-L1 immunohistochemical assays in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):367-376.
- Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-1550.
- Heymann JJ, Bulman WA, Swinarski D, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection in specimens. *Cancer Cytopathol*. 2017;125(12):896-907.
- Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the BluePrint PD-L1 IHC assay comparison project. *J Thorac Oncol*. 2017;12(2):208-222.
- Hofman V, Rouquette I, Long-Mira E, et al. Multicenter evaluation of a novel ROS1 immunohistochemistry assay (SP384) for detection of ROS1 rearrangements in a large cohort of lung adenocarcinoma patients. *J Thorac Oncol*. 2019;14(7):1204-1212.
- Huang RSP, Smith D, Le CH, et al. Correlation of ROS1 immunohistochemistry with ROS1 fusion status determined by fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. Publicado en línea el 11 de septiembre del 2019. doi:10.5858/arpa.2019-0085-OA
- Ibrahim M, Parry S, Wilkinson D, et al. ALK immunohistochemistry in NSCLC: discordant staining can impact patient treatment regimen. *J Thorac Oncol*. 2016;11(12):2241-2247.

- Kondoh C, Horio Y, Hayashi Y, et al. Anaplastic lymphoma kinase expression in small-cell lung cancer. *Histopathology*. 2019;75(1):20-28.
- Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev*. 2018;66:82-94.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):323-358.
- Lu S, Stein JE, Rimm DL, et al. Comparison of biomarker modalities for predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2019;5(8):1195-1204.
- Marchio C, Scaltriti M, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417-1427.
- Minca EC, Portier BP, Wang Z, et al. ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: a correlation between ultrasensitive IHC and FISH. *J Mol Diagn*. 2013;15(3):341-346.
- Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1561-1571.
- Mok T, Peters, S, Camidge DR, et al. Patients with ALK IHC-positive/FISH-negative NSCLC benefit from ALK TKI treatment: response data from the global ALEX trial. *J Thorac Oncol*. 2017;12(11):S1739-S1749.
- Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-024): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10183):1819-1830.
- Morgensztern D, Besse B, Greillier L, et al. Efficacy and safety of rovalpituzumab tesirine in third-line and beyond patients with DLL3-expressing, relapsed/refractory small-cell lung cancer: results from the phase II TRINITY study. *Clin Cancer Res*. 2019;25(23):6958-6966.
- Mullard A. Cancer stem cell candidate Rova-T discontinued. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(11):814.
- Munari E, Rossi G, Zamboni G, et al. PD-L1 assays 22C3 and SP263 are not interchangeable in non-small cell lung cancer when considering clinically relevant cutoffs: an interclone evaluation by differently trained pathologists. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(10):1384-1389.
- Nagasaka M, Ou SI. Neuregulin 1 fusion-positive NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2019;14(8):1354-1359.
- Neuman T, London M, Kania-Almog J, et al. A harmonization study for the use of 22C3 PD-L1 immunohistochemical staining on Ventana's platform. *J Thorac Oncol*. 2016;11(11):1863-1868.
- Nitta H, Tsuta K, Yoshida A, et al. New methods for ALK status diagnosis in non-small-cell lung cancer: an improved ALK immunohistochemical assay and a new, Brightfield, dual ALK IHC-in situ hybridization assay. *J Thorac Oncol*. 2013;8(8):1019-1031.
- Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harbouring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015;5(8):842-849.
- Penault-Llorca F, Rudzinski ER, Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol*. 2019;72(7):460-467.
- Peters S, Dafni U, Boyer M, et al. Position of a panel of international lung cancer experts on the approval decision for use of durvalumab in stage III non-small-cell lung cancer (NSCLC) by the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Ann Oncol*. 2019;30(2):161-165. (a)
- Peters S, Reck M, Smit EF, et al. How to make the best use of immunotherapy as first-line treatment of advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(6):884-896. (b)
- Planchard D, Johnson BE. BRAF adds an additional piece of the puzzle to precision oncology-based treatment strategies in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(7):796-797.
- Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF^{V600E}-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1307-1316.
- Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, et al. Agreement between programmed cell death ligand-1 diagnostic assays across multiple protein expression cutoffs in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3585-3591.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-1833.
- Rimm DL, Han G, Taube JM, et al. A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(8):1051-1058.
- Roge R, Vyberg M, Nielsen S. Accurate PD-L1 protocols for non-small cell lung cancer can be developed for automated staining platforms with clone 22C3. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(6):381-385.

- Salgia R. MET in lung cancer: biomarker selection based on scientific rationale. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(4):555-565.
- Scheel AH, Dietele M, Heukamp LC, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2016;29(10):1165-1172.
- Selinger CI, Li BT, Pavlakis N, et al. Screening for ROS1 gene rearrangements in non-small-cell lung cancers using immunohistochemistry with FISH confirmation is an effective method to identify this rare target. *Histopathology.* 2017;70(3):402-411.
- Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicentre comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2013;26(12):1545-1553.
- Skov BG, Skov T. Paired comparison of PD-L1 expression on cytologic and histologic specimens from malignancies in the lung assessed with PD-L1 IHC 28-8pharmDx and PD-L1 IHC 22C3pharmDx. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(7):453-459.
- Smit EF, Nakagawa K, Nagasaka M, et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients with HER2-mutated metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): interim results of DESTINY-Lung 01. *J Clin Oncol.* 2020;38 (suppl; abstr 9504).
- Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, et al. Results from the phase III randomized trial of onartuzumab plus erlotinib versus erlotinib in previously treated stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer: METLung. *J Clin Oncol.* 2017;35(4):412-420.
- Torlakovic E, Lim HJ, Adam J, et al. "Interchangeability" of PD-L1 immunohistochemistry assays: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *Mod Pathol.* 2020;33(1):4-17.
- Trombetta D, Graziano P, Scarpa A. Frequent NRG1 fusions in Caucasian pulmonary mucinous adenocarcinoma predicted by phosphor-ErbB3 expression. *Oncotarget.* 2018;9(11):9661-9671.
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, eds. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer.* 2.^a ed. IASLC; 2016.
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, eds. *IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer.* IASLC; 2013.
- Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, et al., eds. *IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer.* IASLC; 2017.
- Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 immunohistochemistry comparability study in real-life clinical samples: results of Blueprint phase 2 project. *J Thorac Oncol.* 2018;13(9):1302-1311.
- van der Wekken AJ, Pelgrim R, 't Hart N, et al. Dichotomous ALK-IHC is a better predictor for ALK inhibition outcome than traditional ALK-FISH in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4251-4258.
- von Laffert M, Warth A, Penzel R, et al. Multicenter immunohistochemical ALK-testing of non-small-cell lung cancer shows high concordance after harmonization of techniques and interpretation criteria. *J Thorac Oncol.* 2014;9(11):1685-1692.
- Wang Q, Yang S, Wang K, et al. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):63.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.

Perspectiva final

20

Por Keith M. Kerr, Alain C. Borczuk, Wendy A. Cooper, Sanja Dacic, Andre L. Moreira, Yasushi Yatabe y Ming Sound Tsao

Este atlas proporciona una ilustración extensa del papel crucial que posee la inmunohistoquímica (IHQ) en el diagnóstico de las neoplasias malignas torácicas. Esta técnica tiene un papel importante en cada paso del trayecto diagnóstico que se realiza con las muestras de tejido de nuestros pacientes.

Hemos descrito los principios básicos y la base bioquímica de la IHQ, así como las formas en las que las técnicas de IHQ contribuyen al diagnóstico en numerosos escenarios de neoplasias malignas torácicas, al revisar la esencia de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como la forma en que se pueden lograr los diagnósticos tanto en casos resecaados quirúrgicamente como en muestras de biopsias pequeñas y de citología. Esta última sección en la clasificación de la OMS y en este atlas es de suma importancia debido a que, en el mundo del cáncer de pulmón, al menos dos terceras partes de los pacientes tienen enfermedad en estadio avanzado al momento de la presentación y, por ende, los patólogos solo disponen de muestras de biopsias pequeñas y/o citología para el diagnóstico y las pruebas de biomarcadores predictivos.

Este atlas también ha proporcionado un análisis específico sobre los marcadores individuales que usamos con más frecuencia, así como sobre los diversos clones que están disponibles. Las variaciones que pueden ocurrir entre los clones comercializados para identificar la misma entidad son de considerable importancia, y representan un inconveniente que algunas veces es subestimado por los patólogos. Si no se entienden las características y especificidades de estos clones, las diferencias podrían llevar a una interpretación y diagnóstico errados. Además, la mayor parte de nuestras pruebas de IHQ diagnóstica son, esencialmente, pruebas desarrolladas en laboratorio, lo que significa que puede haber una variación considerable entre los laboratorios con respecto al desempeño de muchas de estas pruebas. En consecuencia, se debe llevar a cabo una validación interna y contundente del protocolo de prueba en el laboratorio para cada marcador antes de su uso clínico. Los problemas adicionales se pueden identificar y rectificar mediante la participación en esquemas externos de aseguramiento de la calidad (EQA) de IHQ.

La práctica diagnóstica patológica contemporánea depende en gran medida de la IHQ. Los patólogos que se capacitan en una era en la que se dispone de una plétora de marcadores

IHQ para identificar innumerables macromoléculas están tentados a usar la tecnología “simplemente porque pueden” en ocasiones en las que quizás no se requiere realmente, aunque la mayor certeza diagnóstica que podría proporcionar la IHQ siempre es bienvenida. Por el contrario, y tal como Juan Rosai lo establece tan elocuentemente en el prólogo de la tercera edición del libro de David J. Dabbs *Diagnostic Immunohistochemistry* (Dabbs, 2010), el uso excesivo o la confianza desmesurada en la IHQ para el diagnóstico de rutina podría llevar al patólogo por el camino equivocado. Muy pocos de los marcadores IHQ analizados aquí son específicos para algún diagnóstico particular, y la gran mayoría de estos marcadores diagnósticos se expresa fisiológicamente. Por lo tanto, es de suma importancia que los hallazgos IHQ siempre sean considerados en el contexto de la morfología tumoral.

Esto se verifica en el diagnóstico del cáncer de pulmón, en particular en el contexto del diagnóstico en muestras pequeñas. La importancia de no usar de forma excesiva la IHQ se enfatiza en la clasificación de la OMS y otros (Lindeman et al., 2018), debido a que una cantidad excesiva de pruebas IHQ realizadas para llegar al diagnóstico inicial puede dejar una cantidad insuficiente de material para las pruebas subsecuentes de biomarcadores predictivos, en especial para las pruebas moleculares (excepto para la hibridación fluorescente *in situ*), las cuales casi siempre requieren más materiales que los necesarios para la IHQ. Este es un problema importante para muchos oncólogos y pacientes (Cane et al., 2015).

¿Cómo puede la IHQ cambiar en el futuro? No cabe duda de que se dispondrá de más clones y marcadores. Gran parte de nuestra evaluación de la IHQ es cualitativa más que cuantitativa y, con el surgimiento de la patología digital, podemos prever una ruta más sencilla para la cuantificación de la expresión de los marcadores IHQ. En el diagnóstico del cáncer de pulmón, la evaluación del Ki-67 puede ser un ejemplo de la manera en que dicha tecnología puede ayudar, pero se necesita evidencia que muestre que la disponibilidad de datos granulares y más precisos para cualquiera de los marcadores que utilizamos tiene valor diagnóstico. Si esto fuese así, entonces sería aún más importante que estandaricemos y controlemos nuestras técnicas IHQ.

Nos enfrentamos a grandes desafíos, los cuales son consecuencia de la disponibilidad de más marcadores y de más permutaciones de perfiles de expresión complejos, pero solo con cantidades pequeñas de tejido. Los rápidos avances tecnológicos han hecho factibles las técnicas IHQ multiplexadas, tanto de campo brillante como de inmunofluorescencia, así como su adopción clínica y para el diagnóstico de rutina. Esto podría brindar soluciones para obtener más información a partir de cantidades limitadas de tejido. Aliadas con la tecnología digital, estas técnicas pueden proporcionar datos espaciales sobre la coexpresión que, hasta ahora, eran muy difíciles de generar. A medida que aumenta la complejidad de los datos, así como el número de permutaciones de los hallazgos con la adición de más puntos de datos (marcadores), es posible que las plataformas de inteligencia artificial tengan un papel en todo este proceso. No obstante, recordamos una vez más que, para que este método se transmita de la investigación a la práctica de rutina, es necesario demostrar su valor clínico. A menudo existe el riesgo de que nuestra tecnología y capacidad para estudiar una muestra de cáncer de pulmón esté muy por delante de los desarrollos en oncología que podrían aprovechar estos datos adicionales. Esto explica la gran importancia de la conexión entre la investigación y la práctica clínica. Quizás es más probable que estos desarrollos en la IHQ multiplexada puedan ser más valiosos en las pruebas de biomarcadores predictivos, tanto en el complejo campo de la inmunoterapia como en la interacción de las vías de señalización aberrantes con las proteínas reguladoras, en células estimuladas por oncogenes adictivos, en especial cuando los tumores desarrollan resistencia a las terapias dirigidas, en lugar de que sean útiles en la etapa inicial del diagnóstico y la clasificación del cáncer de pulmón.

Sin embargo, es probable que la genómica y, por ende, la proteómica, desempeñen un papel cada vez mayor en el diagnóstico y la clasificación del cáncer de pulmón. La clasificación de la OMS del 2015 cambió fundamentalmente al incorporar la expresión de marcadores IHQ en las definiciones básicas del cáncer de células escamosas y del adenocarcinoma. Prevemos más cambios similares a medida que se identifican y definen a nivel molecular subgrupos clínicos importantes del cáncer de pulmón. A pesar de ello, ya que la IHQ permite analizar la expresión de marcadores específicos con resolución de una sola célula usando una cantidad mínima de material tisular, y debido a que las proteínas son los efectores oncogénicos finales y las dianas terapéuticas, esta técnica continuará teniendo un papel clave en el mundo de las pruebas diagnósticas y de biomarcadores (Tsao y Yatabe, 2019). Por lo tanto, será aún más importante comprender en qué forma funciona la IHQ y cómo podría afectar el rendimiento de las pruebas.

La IHQ es una técnica sumamente valiosa y poderosa que, cuando se utiliza de manera correcta y apropiada, puede incrementar grandemente la precisión diagnóstica en casos de cáncer de pulmón y de otros tumores torácicos. Así, al ayudar a determinar las opciones de tratamiento, se ha demostrado con claridad el beneficio para nuestros pacientes que sufren de este grupo de enfermedades biológicamente diversas y frecuentemente mortales. Esperamos que este atlas proporcione un recurso no solo para los patólogos, sino también para todo aquel interesado en el cáncer de pulmón y en su manejo. Este volumen sobre la IHQ diagnóstica en el cáncer de pulmón se suma a la serie de atlas diagnósticos proporcionada por la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC), y seguramente estará acompañado por otros títulos nuevos.

Referencias

- Cane P, Linklater KM, Nicholson AG, et al. Morphological and genetic classification of lung cancer: variation in practice and implications for tailored treatment. *Histopathology*. 2015;67(2):216-224.
- Dabbs DJ, ed. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 3.^a ed. Saunders Elsevier; 2010.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):323-358.
- Tsao MS, Yatabe Y. Old soldiers never die: is there still a role for immunohistochemistry in the era of next-generation sequencing panel testing? *J Thorac Oncol*. 2019;14(12):2035-2038.

Apéndice A: lista de anticuerpos

Nombre del anticuerpo	Función	Especie	Clon	Página de referencia del atlas
Actina, músculo liso	SMA (actina alfa del músculo liso)	Ratón	1A4	113, 120-121, 134-135, 139
		Ratón	ASM-1	
AE1/AE3	Pancitoqueratina	Ratón	AE1/3	49, 67-68, 71-73, 79, 115, 118, 122, 125, 138, 159-160, 162, 168-169
		Ratón	AE1/AE3/PCK26	
ALK	Producto génico de la cinasa del linfoma anaplásico, p80	Ratón	ALK1	6-8, 17, 25, 28, 39-40, 62, 95, 98-99, 133-134, 176-178, 181, 184
		Ratón	5A4	
		Conejo	D5F3	
B72.3	TAG-72 (glicoproteína 72 asociada a tumores)	Ratón	B72.3	157, 159
BAP1	Proteína 1 asociada a BRCA1, cuyo producto se une a la proteína de susceptibilidad al cáncer de mama 1 (BRCA1) a través del dominio de dedo de zinc de esta última y actúa como supresor tumoral	Ratón	C4	4, 162-166
Ber-EP4	Ep-CAM	Ratón	Ber-EP4	157, 159
34βE12	Citoqueratina; reacciona sobre todo a las citoqueratinas 1, 5, 10 y 14 (queratina de alto peso molecular)	Ratón	34βE12	68-69, 71, 73
		Ratón	Cóctel (34βE12+p63)	
BG8, Lewis y	Antígeno sanguíneo de Lewis y	Ratón	F3	157
CAM5.2	CK8, CK7 (en menor medida)	Ratón	CAM5.2	68, 72, 79-80, 119, 159, 173
		Ratón	5D3	
Calretinina	Proteína de unión al calcio de 29 kD que forma parte de la familia de las denominadas proteínas mano EF, que también incluye a las proteínas S100	Ratón	CAL6	4, 69, 136, 138, 157-161
		Ratón	DAK-Calret 1	
		Conejo	DC8	
		Conejo	SP65	
Catenina	β-catenina	Ratón	β-catenina-1	48, 109-112
		Ratón	14	
		Ratón	17C2	
	p120 catenina	Ratón	98	
		Conejo	EP66	

Nombre del anticuerpo	Función	Especie	Clon	Página de referencia del atlas
CD5	Glicoproteína transmembrana de tipo I que se encuentra en la superficie de timocitos, linfocitos T y un subconjunto de linfocitos B, que podría actuar como receptor para regular la proliferación de las células T	Ratón	4C7	69 , 169-170
		Conejo	SP19	
CD31 (PECAM-1)	Molécula de adhesión de células plaquetarias y endoteliales 1 (PECAM1)	Ratón	JC70A	128-129 , 159
		Ratón	1A10	
CD34	Tiene una función en la fijación de las células madre a la matriz extracelular de la médula ósea o a las células estromales	Ratón	QBEnd 10	113 , 115 , 123 , 126 , 128-130 , 132 , 159
		Ratón	MY10	
CD45	Antígeno leucocitario común	Ratón	2B11+PD7/26	37 , 96
		Ratón	RP2/18	
CD56 (NCAM)	Molécula de adhesión celular neural 1	Ratón	123C3	37 , 75-78 , 80-82 , 92 , 130 , 136-137 , 139
		Conejo	MRQ-42	
		Ratón	CD564	
CD99 (MIC2)	Productos génicos de MC2, marcador del sarcoma de Ewing	Ratón	12E7	115 , 136-137 , 167
		Ratón	O13	
		Ratón	PCB1	
CD117 (KIT)	protooncogén KIT, receptor tirosina cinasa	Ratón	EP10	120-121 , 169-171
		Conejo	Policlonal	
		Conejo	9.7	
CDK4	Cinasa dependiente de ciclina 4	Ratón	DCS-31	134-135
CDX2	Proteína caudal homeobox 2	Ratón	DAK-CDX2	104-105 , 107-110 , 114 , 144-146 , 154-157
		Conejo	EPR2764Y	
		Conejo	EP25	
CEA	Antígeno carcinoembrionario	Ratón	CEA31	157 , 159
		Ratón	COL-1	
		Ratón	II-7	
		Ratón	TF3H8-1	
Cromogranina A	Miembro de la familia cromogranina-secretogranina de las proteínas secretoras neuroendocrinas que se encuentra en las vesículas secretoras de las neuronas y las células endocrinas	Ratón	DAK-A3	36 , 76 , 111
		Ratón	LK2H10	
		Ratón	5H7	
		Conejo	EP1030Y	
CK5/6	Citoqueratina 5/6	Ratón	D5/16B4	36 , 41-42 , 45 , 51 , 64-65 , 69 , 71-73 , 114-115 , 119 , 156-157 , 161-162
CK5/6/8/18	Citoqueratina, multi (5/6/8/18), NCL-CK5/6/8/18, NCL-L-CK5/6/8/18, Y RTU-CK5/6/8/18	Ratón	5D3/LP34	67-68 , 79
CK7	Citoqueratina 7	Ratón	OV-TL12/30	45-47 , 51 , 67-73 , 79 , 103-105 , 107-110 , 114 , 119 , 144-146 , 149-152 , 154
		Ratón	RN7	
		Conejo	SP52	
CK20	Citoqueratina 20	Ratón	Ks20.8	71-73 , 79 , 104-105 , 107-110 , 114 , 144-146 , 149-151
		Ratón	PW31	
		Conejo	SP33	

Nombre del anticuerpo	Función	Especie	Clon	Página de referencia del atlas
CK OSCAR	Citoqueratina de amplio espectro	Ratón	OSCAR	67-68, 114, 117, 159, 173
Claudina 4	Proteínas integrales de membrana que son componentes de las uniones estrechas de las células epiteliales	Ratón	3E2C1	126, 157, 159
Desmina	Filamento intermedio	Ratón	D33	127, 134-135, 137-139, 159
		Ratón	DE-R-11	
D2-40	Podoplanina (D2-40)	Ratón	D2-40	157, 159-160, 166, 171
EMA	Antígeno de membrana epitelial	Ratón	E29	113-116, 120, 130
		Ratón	GP1.4	
ER	Receptor de estrógeno	Ratón	6F11	13, 28, 31, 108, 110-111, 146-147, 186
		Conejo	SP1	
	Receptor α de estrógeno	Ratón	1D5	
		Conejo	EP1	
GATA3	Proteína de unión GATA3	Ratón	HG3-31	19, 108, 146-147, 149, 155-156, 160, 166
		Ratón	L50-823	
GCDFP15	Proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica 15	Ratón	23A3	155-156
		Conejo	EP1582Y	
Glipicano 3	Miembro de los proteoglicanos de sulfato de heparán de la superficie celular	Ratón	GC33, 1G12	110, 152, 170-172
		Ratón	IG12	
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3	Conejo	C36B11	135-136, 142
HMB45	Antígeno asociado a melanoma	Ratón	HMB45	139-140, 159
		Ratón	Cóctel triple (HMB45+A103+T311)	
HNF4 α	Fctor nuclear de hepatocitos 4 alfa	Ratón	H1415	106, 145, 156
		Conejo	C11F12	
ISMN1	Poteína 1 asociada al insulinoma	Ratón	A-8	37-38, 75-77, 81, 136
Ki-67	Proteína nuclear asociada a la proliferación celular	Ratón	MIB-1	5-6, 28, 37, 81, 85-89, 93, 114, 116, 190
		Ratón	MM1	
		Ratón	K2	
		Conejo	30-9	
KL1	Pancitoqueratina	Ratón	KL1	67-68, 159
Lu5	Pancitoqueratina	Ratón	Lu5	68
MDM2	Ligasa ubiquitina E3 localizada en el núcleo, que promueve la formación de tumores al dirigirse a las proteínas supresoras de tumores, como p53	Ratón	IF2	134-136
MNF116	CK5/6/8/17	Ratón	MNF116	67-68, 72
MOC31	Ep-CAM/antígeno epitelial específico	Ratón	MOC31	157, 159
MTAP	La metiltioadenosina fosforilasa, utilizada como marcador indirecto de la pérdida homocigótica de p16	Ratón	2G4	163-166

Nombre del anticuerpo	Función	Especie	Clon	Página de referencia del atlas
Napsina A	Miembro de la familia de la peptidasa A1 de las proteasas aspárticas	Ratón	MRQ-60	35-36 , 40-41 , 44-45 , 50-51 , 69 , 92 , 103 , 105 , 108 , 110 , 114 , 118-119 , 124 , 144-147 , 149-150 , 153-154 , 156-157
		Ratón	IP64	
		Conejo	Policlonal	
NKX3.1	NK3 homeobox 1, que codifica un factor de transcripción que contiene homeobox y funciona como regulador negativo del crecimiento de las células epiteliales en el tejido prostático	Conejo	EP356	151 , 154-155 , 157
NUT	Proteína nuclear en el testículo	Conejo	C52B1	5 , 7 , 14 , 46-47 , 51 , 63 , 75 , 82 , 113-118 , 122-124 , 127
OCT3/4	POU clase 5 homeobox 1, que codifica un factor de transcripción que contiene un homeodominio POU que desempeña un papel clave en el desarrollo embrionario y la pluripotencia de las células madre	Ratón	N1NK	170-171
p16	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A, CDKN2A	Ratón	E6H4	143-144 , 163 , 165-166
		Ratón	G175-405	
		Ratón	JC8	
p40	Isoforma del producto TP63, también conocida como Δ NP63	Ratón	BC28	2 , 28 , 35-38 , 41-48 , 50-51 , 56 , 60-65 , 69-70 , 74 , 78 , 80-81 , 92 , 105-106 , 111 , 114-117 , 119-121 , 130 , 149 , 152 , 157 , 159 , 168-170
p63	Producto de TP63	Ratón	4A4	2 , 28 , 41-42 , 45 , 50-52 , 60-65 , 74 , 80-81 , 100 , 114-115 , 119-122 , 149 , 156-157 , 168-169
		Ratón	Cóctel (34 β E12+p63)	
		Ratón	DAK-p63	
		Ratón	7JUL	
PAX8	Paired box 8, un factor de transcripción que regula el desarrollo de la tiroides	Ratón	MRQ-50	108 , 110-111 , 148-150 , 153-157 , 168-169 , 174
		Ratón	PAXR1	
S100	Proteína de unión al calcio	Conejo	Policlonal	113 , 120-122 , 127 , 135 , 139 , 159
SALL4	Factor de transcripción tipo Spalt 4, el cual codifica un factor de transcripción de dedo de zinc que se cree que desempeña un papel en el desarrollo de las neuronas motoras abducens	Ratón	6E3	110-111 , 126 , 170-173
SMARCA4/BRG1	Regulador de la cromatina relacionado con SWI/SNF, asociado a la matriz y dependiente de la actina, subfamilia a, miembro 4, que codifica un miembro de la familia de proteínas SWI/SNF	Ratón	G-7	5 , 7 , 12 , 51 , 125-128
		Conejo	EPNCIR111A	
SMARCB1 (BAF47, hSNF5, INI1)	Regulador de la cromatina relacionado con SWI/SNF, asociado a la matriz y dependiente de la actina, subfamilia b, miembro 1, que forma parte de un complejo que alivia las estructuras represivas de la cromatina	Ratón	25/BAF47	126 , 130-131
SOX10	El factor de transcripción SRY-box 10, codifica un miembro de la familia SOX (HMG-box relacionado con SRY) de factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular	Conejo	SP267	135 , 146-147
		Ratón	Policlonal	

Nombre del anticuerpo	Función	Especie	Clon	Página de referencia del atlas
STAT6	Transductor de señal y activador de transcripción 6 que codifica un miembro de la familia de factores de transcripción STAT	Conejo	Policlonal	130-133 , 159
		Conejo	Policlonal (SC-20)	
		Conejo	YE361	
Sinaptofisina	Proteína de la membrana integral de las pequeñas vesículas sinápticas del cerebro y de las células endocrinas	Ratón	DAK-SYNAP	37 , 40 , 75-81 , 93 , 109-110 , 130-131 , 136-137 , 139
		Ratón	27G12	
		Conejo	MRQ-40	
		Conejo	SP11	
TTF1	Factor 1 de transcripción tiroidea, también conocido como NKX2-1; un factor de transcripción para regular el desarrollo de la tiroides y el pulmón	Ratón	8G7G3/1	2 , 28 , 34-36 , 38-40 , 43-48 , 50-51 , 53-59 , 62 , 65 , 69-70 , 72 , 92-93 , 96 , 103-111 , 113-121 , 127 , 139 , 144-148 , 150-153 , 158-159 , 178
		Ratón	SPT24	
		Conejo	SP141	
WT1	Proteína del tumor de Wilms	Ratón	6F-H2	4 , 69 , 136-138 , 157-160
		Ratón	WT49	

Apéndice B: fabricantes

Los siguientes fabricantes y sus productos aparecen en este atlas. Las ubicaciones indicadas para cada fabricante no son las únicas; la mayoría tienen oficinas en todo el mundo.

[Abcam](#)

Cambridge, Reino Unido

[Abnova](#)

Taipéi, Taiwán

[Active Motif](#)

Carlsbad, California, Estados Unidos

[Agilent Dakot](#)

Santa Clara, California, Estados Unidos

[BD Biosciences](#)

San José, California, Estados Unidos

[BioLegend](#)

San Diego, California, Estados Unidos

[Cell Signaling Technology, Inc.](#)

Danvers, Massachusetts, Estados Unidos

[Invitrogen - Thermo Fisher Scientific](#)

Carlsbad, California, Estados Unidos

[Leica Biosystems](#)

Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos

[Nichirei Bioscience](#)

Tokio, Japón

[Roche Tissue Diagnostics](#)

Tucson, Arizona, Estados Unidos

[Santa Cruz Biotechnology, Inc.](#)

Dallas, Texas, Estados Unidos

[Sigma-Aldrich](#)

San Luis, Misuri, Estados Unidos

[Signet Laboratories, Inc.](#)

Dedham, Massachusetts, Estados Unidos

