



Avaliação prospectiva de espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA quanto à expressão de *programmed death-ligand 1* em pacientes com câncer pulmonar de células não pequenas: um estudo piloto

Juliana Guarize¹, Elena Guerini Rocco², Filippo de Marinis³,
Giulia Sedda⁴, Luca Bertolaccini⁴, Stefano Maria Donghi¹,
Monica Casiraghi⁴, Clementina Di Tonno², Massimo Barberis²,
Lorenzo Spaggiari^{4,5}

1. Pneumologia Interventistica, Divisione di Chirurgia Toracica, Istituto Europeo di Oncologia – IEO – Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico – IRCCS – Milano, Italia.
2. Divisione di Anatomia Patologica, Istituto Europeo di Oncologia – IEO – Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico – IRCCS – Milano, Italia.
3. Divisione di Oncologia Toracica, Istituto Europeo di Oncologia – IEO – Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico – IRCCS – Milano, Italia.
4. Divisione di Chirurgia Toracica, Istituto Europeo di Oncologia – IEO – Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico – IRCCS – Milano, Italia.
5. Dipartimento di Oncologia ed Emato-Oncologia, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia.

Recebido: 30 novembro 2020.

Aprovado: 6 abril 2021.

Trabalho realizado no Istituto Europeo di Oncologia, Milão, Itália.

RESUMO

Objetivo: A amostragem citológica por meio de EBUS-TBNA é realizada rotineiramente para diagnóstico anatomopatológico, estadiamento mediastinal e teste molecular em pacientes com câncer de pulmão. As amostras obtidas por meio de EBUS-TBNA não são formalmente aceitas para testar a expressão da proteína *programmed death-ligand 1* (PD-L1, ligante de morte celular programada 1). O objetivo do estudo foi comparar a viabilidade, reprodutibilidade e precisão da avaliação da expressão de PD-L1 em espécimes citológicos e amostras histológicas. **Métodos:** Foram coletadas prospectivamente amostras histológicas (obtidas por meio de biópsia transbrônquica com pinça) e citológicas (obtidas por meio de EBUS-TBNA) de lesões neoplásicas peribrônquicas durante um procedimento endoscópico na mesma lesão-alvo para o diagnóstico anatomopatológico e avaliação molecular de câncer pulmonar de células não pequenas (CPCNP) em estágio IV. **Resultados:** Quinze pacientes foram submetidos ao procedimento. Amostras citológicas adequadas (pelo menos 100 células neoplásicas) foram obtidas em 12 casos (92,3%). A expressão de PD-L1 nas amostras histológicas e citológicas foi semelhante (taxa de concordância = 92%). A sensibilidade e precisão diagnóstica das amostras citológicas obtidas por meio de EBUS-TBNA foram de 88,9% e 100%, respectivamente. **Conclusões:** A avaliação da expressão de PD-L1 em espécimes citológicos obtidos por meio de EBUS-TBNA é viável e apresenta boa reprodutibilidade quando comparada com amostras histológicas rotineiras. Amostras citológicas obtidas por meio de EBUS-TBNA podem ser usadas para avaliar a expressão de PD-L1 como uma abordagem minimamente invasiva em pacientes com CPCNP em estágio IV.

Descritores: Ultrassonografia; Biópsia por agulha; Neoplasias pulmonares; Terapia de alvo molecular.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços das modalidades diagnósticas e métodos de imagem, o câncer de pulmão ainda é uma das principais causas de morte em todo o mundo.⁽¹⁾ Até 80% dos pacientes apresentam doença avançada no momento do diagnóstico, e a terapia sistêmica pode ser a única opção de tratamento.^(2,3)

Novas estratégias terapêuticas com drogas voltadas para alvos moleculares envolvidos em alterações genéticas têm se mostrado a melhor opção de tratamento em vários cenários clínicos.⁽⁴⁾ As terapias de alvo molecular melhoram a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma metastático com mutações genéticas como *epidermal growth factor receptor* (EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico), ALK, *ROS proto-oncogene*

1 tyrosine kinase (ROS1) e rearranjo do *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* (BRAF).⁽⁵⁾

Mais recentemente, a imunoterapia com anticorpos monoclonais bloqueadores da proteína *programmed death-ligand 1* (PD-L1, ligante de morte celular programada 1) tem se mostrado uma opção de tratamento promissora quanto à sobrevida global de pacientes com câncer pulmonar de células não pequenas (CPCNP) avançado em comparação com a quimioterapia-padrão.⁽⁶⁾ Assim, a avaliação da expressão da proteína PD-L1 é essencial para identificar os pacientes que mais podem se beneficiar da imunoterapia.^(7,8)

Nos últimos anos, procedimentos minimamente invasivos se tornaram o padrão para o diagnóstico e estadiamento de pacientes com CPCNP. Procedimentos

Endereço para correspondência:

Juliana Guarize. Departamento de Chirurgia Toracica, Istituto Europeo di Oncologia, Via Ripamonti, 435, Milano, 20141, Italia.
Tel.: 39 02 5748-9940. Fax: 39 02 9437-9218. E-mail: juliana.guarize@ieo.it
Apoio financeiro: Nenhum.

como EBUS-TBNA frequentemente fornecem todas as informações necessárias, desde a amostragem de tecido até a avaliação molecular, e causam poucas complicações.⁽⁹⁻¹²⁾ Espécimes citológicos obtidos por meio de EBUS-TBNA têm sido usados com sucesso para a avaliação de diversos alvos moleculares, tais como *EGFR*, *ALK* e *ROS1*,⁽⁸⁾ e têm se mostrado adequados e comparáveis a amostras histológicas para a avaliação de marcadores-alvo.⁽¹³⁾

Ensaio imunohistoquímico diagnóstico para avaliar a expressão de PD-L1 em células tumorais foram oficialmente elaborados para testar amostras de tecido tumoral.⁽¹⁴⁾ No entanto, seu uso na avaliação citológica de blocos de células não é “mundialmente” aceito, especialmente em pacientes incluídos em estudos clínicos. Portanto, o objetivo deste estudo piloto foi comparar a viabilidade e reprodutibilidade da avaliação da expressão de PD-L1 em espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA e espécimes histológicos.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição, e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Pacientes com suspeita de CPCNP avançado (estágio IV) foram submetidos a broncoscopia para definição anatomopatológica, e foi realizada a avaliação molecular das lesões pulmonares. Os pacientes foram selecionados com base na identificação de lesões na TC com alta probabilidade de amostragem tanto por EBUS-TBNA como por biópsia transbrônquica. Durante o procedimento, amostras histológicas (biópsia transbrônquica) e citológicas (EBUS-TBNA) foram extraídas da mesma lesão neoplásica peribrônquica. O fluxograma do procedimento é apresentado na Figura 1.

Quinze pacientes consecutivos submetidos à broncoscopia para o diagnóstico anatomopatológico e avaliação da expressão molecular de PD-L1 foram incluídos na análise. Foram considerados adequados os espécimes com pelo menos 100 células tumorais viáveis. Amostras com menos de 100 células tumorais viáveis foram consideradas inadequadas e foram excluídas da análise.⁽¹⁵⁾

Amostras obtidas por EBUS-TBNA

As amostras obtidas por meio de EBUS-TBNA foram extraídas de lesões peribrônquicas adjacentes às vias aéreas. O procedimento foi realizado sob anestesia local (lidocaína a 1%) e sedação moderada realizada por um anestesiológico. A ventilação foi espontânea. Todos os procedimentos foram realizados pela mesma equipe de pneumologistas intervencionistas com uma sonda convexa (EBUS Convex Probe BF-UC180F; Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburgo, Alemanha) e um processador de ultrassom exclusivo (EU-ME2; Olympus Europa SE & Co. KG). Os espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA foram extraídos com uma agulha de calibre 22 específica para esse fim (Vizishot NA-201SX-4022; Olympus Europa SE & Co. KG).

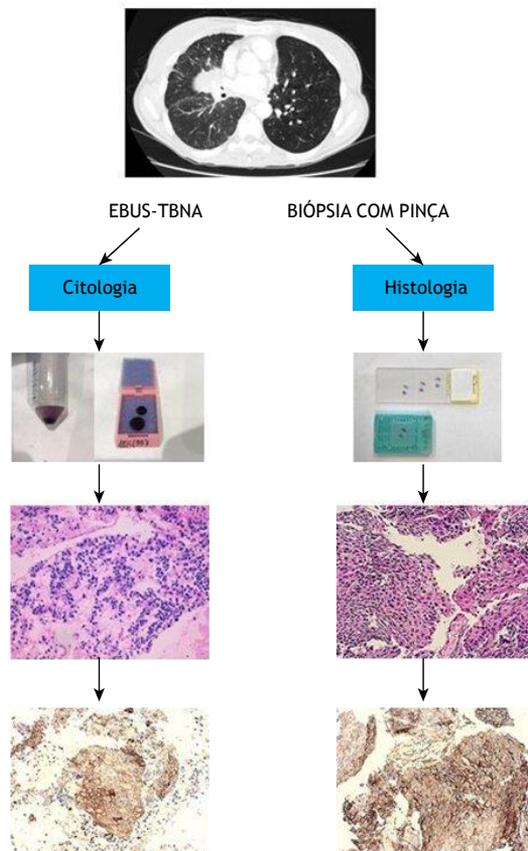


Figura 1. Fluxograma da coleta e análise de espécimes citológicos e histológicos. Foram obtidas amostras da mesma lesão peribrônquica por meio de biópsia com pinça (lado direito) e EBUS-TBNA (lado esquerdo).

Uma quantidade bem pequena do material aspirado foi empurrada para fora pelo estilete interno e montada em lâminas de vidro, seca ao ar e corada pelo método modificado de May-Grünwald-Giemsa (Diff-Quik) para *rapid on-site evaluation* (ROSE, avaliação rápida no local). O restante do aspirado e outras passagens da agulha — no mínimo 3, variando de 3 a 5 de acordo com a porcentagem de células tumorais no esfregaço (ROSE) — foram colocados em solução salina para processamento dos blocos de células e avaliação citológica adicional.⁽¹⁰⁾

Amostras histológicas

A biópsia transbrônquica foi realizada por meio da introdução de uma pinça endoscópica grande (2,8 mm) na lesão pulmonar. Lesões pulmonares neoplásicas foram previamente confirmadas por meio de sonda radial de EBUS e fluoroscopia, e a bainha guia (SG-201-C; Olympus Europa SE & Co. KG) foi usada para manter a pinça na posição correta. Não foi realizada a biópsia de lesões endobrônquicas visíveis.

A primeira amostra obtida por biópsia foi esfregada em uma lâmina de vidro para “impressão” (*imprinting*) da biópsia e avaliação citológica imediata (ROSE) quanto à adequação do espécime. Assim que se confirmava a adequação do espécime, mais biópsias eram realizadas

e imediatamente fixadas em formalina para a avaliação histológica, conforme descrito anteriormente.⁽¹⁶⁾

Aspectos técnicos de PD-L1 e imuno-histoquímica

Blocos de células provenientes de espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA foram preparados sem fixador à base de metanol. O material citológico foi centrifugado, corado com H&E, revestido com agarose líquida para formar um bloco firme de células e finalmente processado em conformidade com métodos histopatológicos usados como padrão para amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina.⁽¹⁷⁾

Dez cortes consecutivos de 2 a 3 mm de espessura foram obtidos de cada bloco de células; o primeiro e o último corte foram corados com H&E para garantir que células tumorais diagnósticas estivessem presentes em todas as lâminas. Em alguns casos, a fim de diferenciar adenocarcinoma de carcinoma de células escamosas, foi realizada a análise imunocitoquímica de *thyroid transcription factor-1* (fator de transcrição tireoideano 1) e p40 (um anticorpo que reconhece ΔNp63, uma isoforma de p63 altamente específica para células escamosas/basais).⁽¹⁸⁾

A expressão de PD-L1 foi avaliada com o kit PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), um ensaio imuno-histoquímico qualitativo com anticorpo monoclonal murino anti-PD-L1, clone 22C3, com o sistema de visualização EnVision FLEX em Autostainer Link 48 (Agilent Technologies).⁽¹⁵⁾

Foram considerados adequados os espécimes com pelo menos 100 células tumorais viáveis. Em cada caso, calculou-se o *tumor proportion score* (TPS). O TPS é a proporção de células tumorais viáveis que apresentam coloração parcial ou completa da membrana. O TPS era considerado negativo quando a proporção de células coradas era < 1%, fracamente positivo quando a proporção de células coradas era = 1-49% e fortemente positivo quando a proporção de células coradas era ≥ 50%.

Dois patologistas experientes examinaram todas as amostras de forma independente. As divergências foram discutidas e resolvidas por consenso. As amostras obtidas por meio de biópsia com pinça foram processadas em conformidade com o padrão para métodos histopatológicos.

Análise estatística

Os dados contínuos foram relatados em forma de médias e desvios-padrão. Os dados categóricos e numéricos foram apresentados em forma de frequência absoluta e relativa. Amostras inadequadas (amostras de biópsia adequadas com > 100 células viáveis, porém amostras inadequadas de EBUS-TBNA) foram excluídas da análise de precisão porque o objetivo do estudo era mostrar concordância entre as amostras. Para testar a correlação entre as classes de risco, foi usado o teste de correlação de postos de Spearman. Uma curva ROC foi gerada para determinar o melhor limite. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o programa RStudio, versão 3.6.1 "Action of the Toes" (RStudio Inc., Boston, MA, EUA), com os pacotes *standard*, *rcmdr* e *irr*.^(19,20)

RESULTADOS

Quinze pacientes foram incluídos no estudo. Amostras adequadas (pelo menos 100 células neoplásicas viáveis) foram obtidas de espécimes citológicos e histológicos em 12 pacientes (80%). As características demográficas dos pacientes foram: 13 pacientes do sexo masculino (83,3%); mediana da idade = 66 anos (variação: 54-78 anos). No tocante aos tipos de células tumorais, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas foram identificados em 11 e 4 pacientes, respectivamente. Os resultados histológicos e citológicos da expressão de PD-L1 são apresentados na Tabela 1.

Três pacientes com amostras inadequadas foram incluídos na análise agregada, porém excluídos da análise de precisão. Em 11 pacientes, houve

Tabela 1. Subtipos histológicos e resultados da expressão de *programmed death-ligand 1* (PD-L1, ligante de morte celular programada 1).

Paciente	Subtipo histológico	Histologia para PD-L1 (TPS%)	Citologia para PD-L1 (TPS%)
1	Adenocarcinoma	5	2
2	Adenocarcinoma	2	< 1
3	Adenocarcinoma	90	90
4	Carcinoma de células escamosas	60	60
5	Adenocarcinoma	< 1	< 1
6	Adenocarcinoma	60	55
7	Adenocarcinoma	80	75
8	Adenocarcinoma	80	80
9	Adenocarcinoma	80	70
10	Adenocarcinoma	70	70
11	Carcinoma de células escamosas	< 1	< 1
12	Adenocarcinoma	70	80
13	Carcinoma de células escamosas	80	-
14	Adenocarcinoma	2	-
15	Carcinoma de células escamosas	2	-

TPS%: *tumor proportion score* em %.

concordância completa entre os resultados citológicos e histológicos da expressão de PD-L1, independentemente dos subtipos: adenocarcinoma, em 9 pacientes (Figura 2); carcinoma de células escamosas, em 2 (Figura 3). Em um caso (adenocarcinoma), houve resultados divergentes (citologia negativa e histologia fracamente positiva). Os resultados da expressão de PD-L1 em amostras citológicas obtidas por meio de EBUS-TBNA apresentaram área sob a curva ROC = 0,79 (Figura 4A). A sensibilidade, precisão diagnóstica e valor preditivo negativo foram = 88,9%, 91,7% e 75,0%, respectivamente. A coloração para PD-L1 apresentou reação negativa, reação fracamente positiva e reação fortemente positiva em 16,7%, 16,7% e 66,7% das amostras histológicas, respectivamente, e em 25,0%, 8,3% e 66,7% das amostras citológicas.

Com os diferentes pontos de corte para a expressão de PD-L1, a concordância entre espécimes histológicos e citológicos considerados negativos, fracamente positivos e fortemente positivos foi de 80%, 67% e 100%, respectivamente. O teste de correlação de postos de Spearman mostrou uma correlação altamente significativa entre o TPS das amostras histológicas e citológicas ($\rho = 0,836$; $p = 0,0060$; Figura 4B).

DISCUSSÃO

Atualmente, EBUS-TBNA faz parte da prática clínica rotineira diária em diversas doenças torácicas.⁽¹⁰⁾

Como é pouco invasiva e possibilita a obtenção de repetidas amostras, a EBUS-TBNA é frequentemente o procedimento de escolha para o diagnóstico anatomopatológico e avaliação molecular em pacientes com CPCNP em estágio avançado.⁽²¹⁾ Até 80% dos pacientes com CPCNP apresentam doença avançada no momento do diagnóstico e são possíveis candidatos a tratamento farmacológico direcionado.⁽²⁾ Em nossa experiência, até 98,5% dos pacientes são diagnosticados com um procedimento minimamente invasivo que fornece espécimes citológicos e blocos de células.⁽¹⁰⁾

A abordagem oncológica moderna combina procedimentos minimamente invasivos com tratamentos oncológicos menos invasivos para melhor sobrevida e menores taxas de complicações. Na era da terapia de alvo molecular, é essencial que se elabore a melhor modalidade possível, que permita a aquisição de quantidades suficientes de tecido de alta qualidade sem cirurgia. O teste molecular é fundamental para o manejo de pacientes com CPCNP, especialmente para o direcionamento da terapia específica com inibidores de tirosina quinase voltados para EGFR e outros marcadores moleculares.⁽⁸⁾ Mutações que podem ser alvo de terapia molecular, tais como a do gene *EGFR*, foram inicialmente avaliadas em espécimes histológicos até que se demonstrasse que também poderiam ser avaliadas em espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA com sensibilidade equivalente.⁽¹³⁾

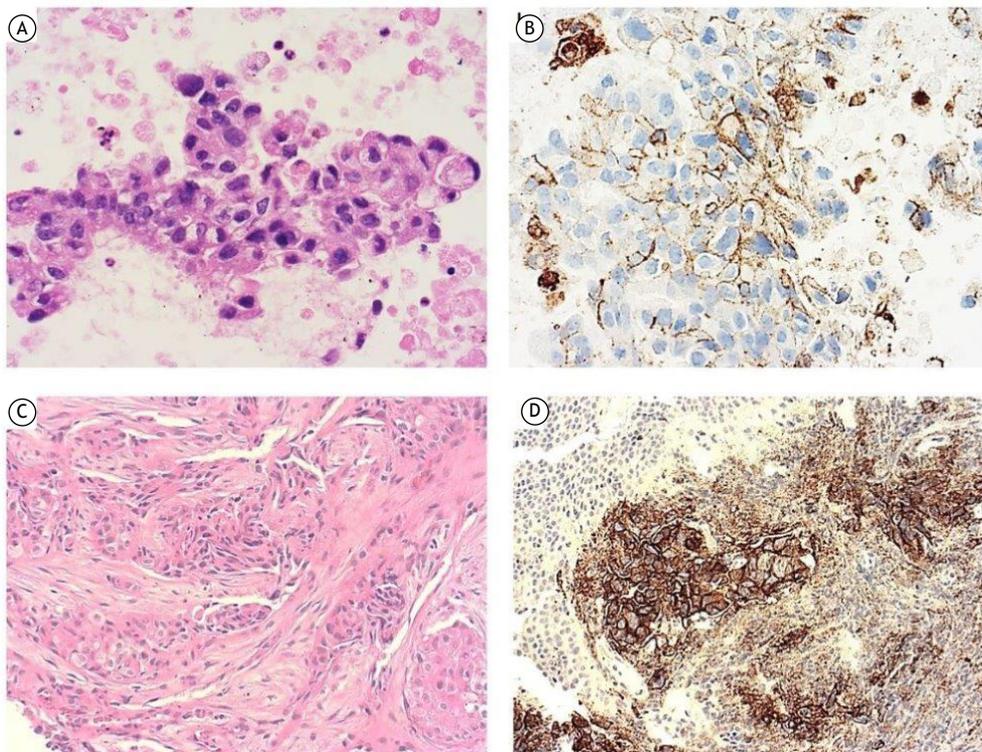


Figura 2. Fotomicrografias de amostras obtidas por meio de EBUS-TBNA (A e B; cortes de blocos de células fixados em formalina e incluídos em parafina) e de biópsia com pinça (C e D) em um paciente com diagnóstico de adenocarcinoma (sólido), com H&E (A e C) e coloração para PD-L1 (B e D). A porcentagem de células positivas para PD-L1 é superior a 50% em ambas as amostras.

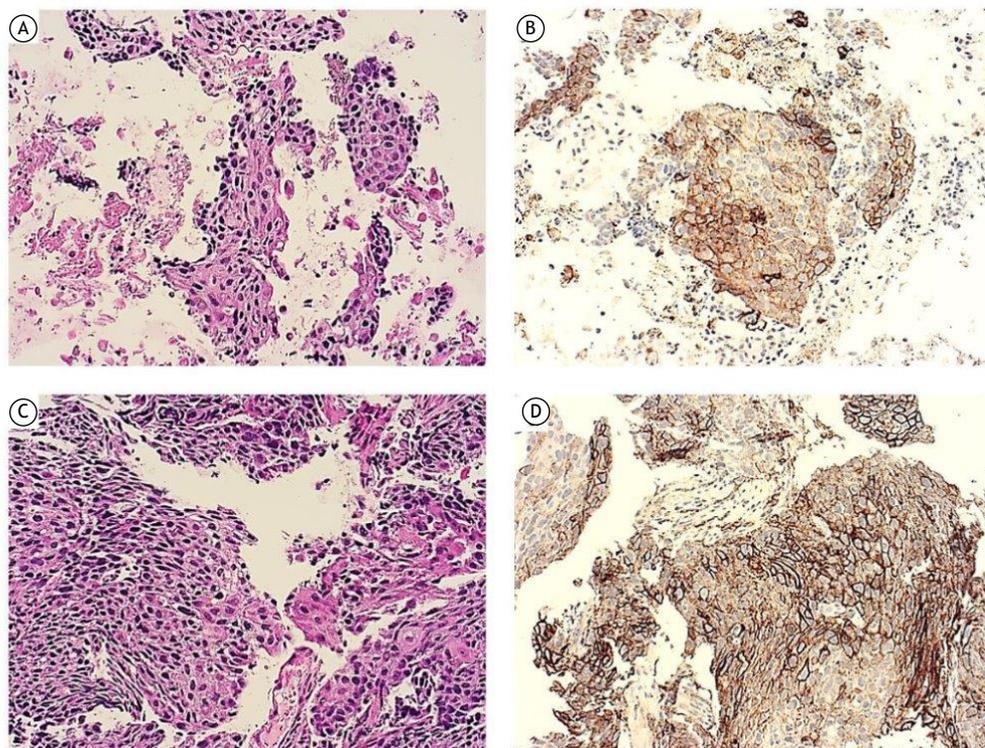


Figura 3. Fotomicrografias de amostras obtidas por meio de EBUS-TBNA (A e B; cortes de blocos de células fixados em formalina e incluídos em parafina) e de biópsia com pinça (C e D) em um paciente com diagnóstico de carcinoma de células escamosas não queratinizante, com H&E (A e C) e coloração para PD-L1 (B e D). A porcentagem de células positivas para PD-L1 é superior a 50% em ambas as amostras.

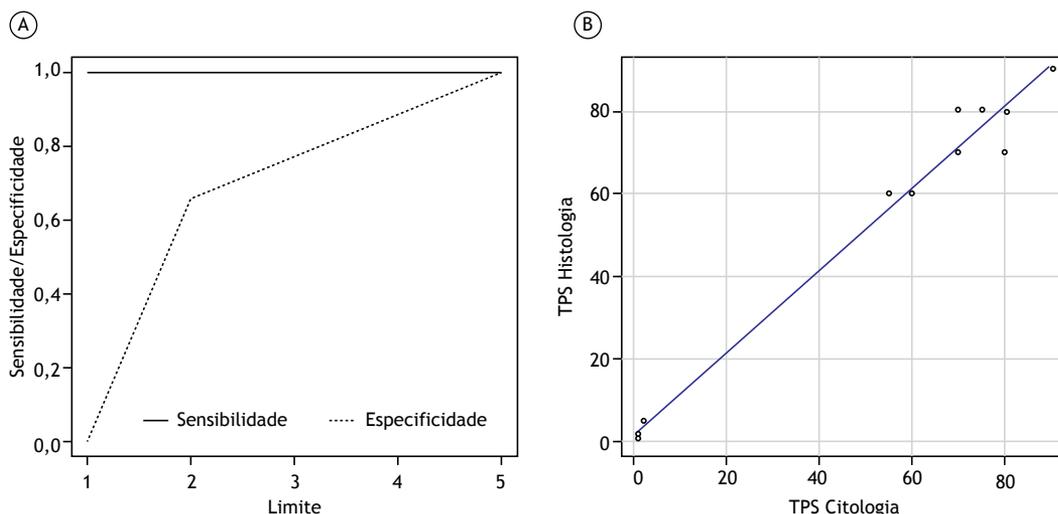


Figura 4. Em A, curva ROC dos resultados da expressão de *programmed death-ligand 1* (ASC = 0,79; sensibilidade = 88,9%; especificidade = 91,7%). Em B, gráfico de dispersão do *tumor proportion score* (TPS) da citologia e histologia ($\rho = 0,836$; $p = 0,006$).

Nos últimos anos, a imunoterapia para o tratamento de câncer de pulmão com agentes voltados para vias de correceptores imunes como PD-L1 tem apresentado resultados promissores, com respostas clínicas prolongadas e toxicidade tolerável.⁽⁶⁾

A seleção de pacientes que podem se beneficiar da imunoterapia é obrigatória no CPCNP avançado,⁽²²⁾ e

PD-L1 é o único biomarcador validado e aprovado como ferramenta diagnóstica auxiliar antes da imunoterapia na prática clínica. Juntamente com EGFR, BRAF, ALK e ROS1, PD-L1 é um biomarcador obrigatório a ser avaliado em amostras usadas para o diagnóstico anatomopatológico de CPCNP de modo que se possa oferecer a melhor estratégia de tratamento. Também

são recomendados outros marcadores, tais como HER2, KRAS, RET e *MET 14 exon skipping mutation* (mutação que resulta na perda da transcrição do éxon 14 do gene *MET*).⁽²³⁾

Até o momento, o padrão ouro para a avaliação da expressão de PD-L1 é a imuno-histoquímica realizada em espécimes histológicos fixados em formalina e incluídos em parafina,⁽²⁴⁾ e há poucas evidências de que a expressão de PD-L1 possa ser avaliada de forma confiável em espécimes citológicos obtidos por meio de EBUS-TBNA na prática clínica diária. Um estudo anterior⁽²⁵⁾ relatou a viabilidade da avaliação citológica de PD-L1 em uma variedade de 30 preparações citológicas a partir de amostras extraídas de pacientes com CPCNP. Os autores concluíram que os blocos de células poderiam substituir o tecido histológico na determinação da expressão de PD-L1 em pacientes com CPCNP. No entanto, o estudo avaliou diferentes tipos de espécimes citológicos envolvendo diferentes tipos de tumores, diferentes locais de coleta e diferentes processos analíticos laboratoriais, que resultaram em diversos vieses.⁽²⁵⁾

Outro estudo⁽²⁶⁾ relatou uma comparação entre amostras citológicas e histológicas. O estudo apresentou um viés considerável relacionado com a falta de padronização das amostras citológicas e histológicas. As amostras citológicas foram extraídas de diferentes locais com diferentes tipos de agulha, e as amostras histológicas foram extraídas de muitos locais diferentes, inclusive biópsias com agulha. Além disso, as amostras citológicas e histológicas não foram coletadas ao mesmo tempo. Foram incluídos na análise diferentes subtipos patológicos, inclusive mesotelioma maligno e metástases que não câncer de pulmão. Como se sabe, a expressão de PD-L1 em tumores é dinâmica e pode mudar ao longo do tempo e de acordo com diferentes sítios tumorais; portanto, coletar amostras em momentos diferentes pode gerar um viés na análise da expressão de PD-L1.⁽⁷⁾ No presente estudo, avaliamos prospectivamente a viabilidade da expressão de PD-L1 em amostras obtidas por meio de EBUS-TBNA, comparando-as com espécimes histológicos da mesma lesão coletados ao mesmo tempo, evitando assim qualquer tipo de viés de coleta ou seleção que pudesse alterar o perfil de expressão de PD-L1.

Nossos resultados mostraram uma excelente concordância entre os espécimes citológicos e histológicos na avaliação da expressão de PD-L1 em espécimes de CPCNP. A concordância entre os espécimes histológicos e citológicos no que tange à expressão de PD-L1 foi de 80%, 67% e 100%, respectivamente, para resultados negativos, fracamente positivos e

fortemente positivos. Em um caso, houve resultados divergentes: citologia negativa (< 1%) e histologia fracamente positiva focal (2%). Excluímos amostras inadequadas (biópsia adequada com > 100 células tumorais viáveis, porém amostras obtidas por meio de EBUS-TBNA com < 100 células viáveis). Amostras inadequadas apresentaram relação com a presença de sangue em excesso ou necrose no bloco de células.

Este estudo piloto tem limitações. A principal limitação foi o pequeno número de pacientes incluídos na análise. Não é muito comum selecionar pacientes com lesões peribrônquicas passíveis de biópsia com pinça e EBUS-TBNA, mas era obrigatório para excluir qualquer possível viés de amostragem. Outra limitação do estudo está relacionada com a reprodutibilidade dos resultados da expressão de PD-L1 em espécimes linfonodais obtidos por meio de EBUS-TBNA. Embora possa haver diferença entre o tumor primário e a metástase linfonodal quanto à expressão de PD-L1, há relatos de boa concordância (70-90%) com pontos de corte clinicamente relevantes.⁽²⁴⁾

No presente estudo, embora a amostra tenha sido pequena, a viabilidade e reprodutibilidade dos resultados da expressão de PD-L1 em espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA demonstraram que é possível obter amostra de tecido suficiente por meio de um único procedimento para diagnóstico anatomopatológico, estadiamento e avaliação molecular completa, o que forma a base da era da terapia personalizada que combina procedimentos minimamente invasivos com agentes imunobiológicos para que se obtenham os melhores resultados oncológicos. A boa concordância entre as amostras histológicas e citológicas mostra resultados promissores para a avaliação da expressão de PD-L1 em espécimes obtidos por meio de EBUS-TBNA. Mais estudos são necessários para confirmar essa evidência.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Sra. Susan Jane West, tradutora profissional de inglês, a revisão do manuscrito.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

JG e LS: concepção e desenho do estudo; materiais ou encaminhamento de pacientes. LS: concepção e desenho do estudo. FDM e SMD: materiais ou encaminhamento de pacientes. EGR, CDT e MB: coleta/compilação dos dados. LB e MC: análise e interpretação dos dados. GS: apoio administrativo. Todos os autores: redação e revisão do manuscrito; aprovação da versão final.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneve: WHO [cited 2020 Nov 1]. Health topics: Cancer. Available from: <https://www.who.int/health-topics/cancer>
2. Reckamp KL, editor. Lung cancer: Treatment and Research. London: Springer; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2>
3. Spaggiari L, Casiraghi M, Guarize J, Brambilla D, Petrella F, Maisonneuve P, et al. Outcome of Patients With pN2 "Potentially Resectable" Nonsmall Cell Lung Cancer Who Underwent Surgery After Induction Chemotherapy. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;28(2):593-602. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2015.12.001>

4. Yuan M, Huang LL, Chen JH, Wu J, Xu Q. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4:61. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0099-9>
5. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, 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. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP>
6. Sui H, Ma N, Wang Y, Li H, Liu X, Su Y, et al. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies. *J Immunol Res.* 2018;2018:6984948. <https://doi.org/10.1155/2018/6984948>
7. Ilie M, Hofman P. Reproducibility of PD-L1 assessment in non-small cell lung cancer-know your limits but never stop trying to exceed them. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(Suppl 1):S51-S54. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.10.13>
8. Arbour KC, Riely GJ. Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA.* 2019;322(8):764-774. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11058>
9. Casiraghi M, Galetta D, Borri A, Tessitore A, Romano R, Diotti C, et al. Ten Years' Experience in Robotic-Assisted Thoracic Surgery for Early Stage Lung Cancer. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2019;67(7):564-572. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1639575>
10. Guarize J, Casiraghi M, Donghi S, Diotti C, Vanoni N, Romano R, et al. Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration in Thoracic Diseases: Much More than Mediastinal Staging. *Can Respir J.* 2018;2018:4269798. <https://doi.org/10.1155/2018/4269798>
11. Labarca G, Folch E, Jantz M, Mehta HJ, Majid A, Fernandez-Bussy S. Adequacy of Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound with Transbronchial Needle Aspiration for Molecular Analysis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(10):1205-1216. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201801-045OC>
12. Almeida FA, Casal RF, Jimenez CA, Eapen GA, Uzbeck M, Sarkiss M, et al. Quality gaps and comparative effectiveness in lung cancer staging: the impact of test sequencing on outcomes. *Chest.* 2013;144(6):1776-1782. <https://doi.org/10.1378/chest.12-3046>
13. Guerini-Rocco E, Passaro A, Casadio C, De Luca VM, Guarize J, de Marinis F, et al. Acquired Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancers: The Role of Next-Generation Sequencing on Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Samples. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(4):465-473. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0158-RA>
14. Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria JC, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch.* 2016;468(5):511-525. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1910-4>
15. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual - Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). Santa Clara (CA): Agilent Technologies; 2020.
16. Guarize J, Donghi S, Saueressig MG. Radial-probe EBUS for the diagnosis of peripheral pulmonary lesionsAUTHORS' REPLYRadial-probe EBUS for the diagnosis of peripheral pulmonary lesionsFactors influencing visibility and diagnostic yield of transbronchial biopsy using endobronchial ultrasound in peripheral pulmonary lesionsRadial probe endobronchial ultrasound for the diagnosis of peripheral lung cancer: systematic review and meta-analysis. *J Bras Pneumol.* 2017;43(1):76-77. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000379>
17. Casadio C, Guarize J, Donghi S, Di Tonno C, Fumagalli C, Vacirca D, et al. Molecular Testing for Targeted Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Suitability of Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration. *Am J Clin Pathol.* 2015;144(4):629-634. <https://doi.org/10.1309/AJCPXGRAIMB4CTQ3>
18. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2015.
19. The R Foundation [homepage on the Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; [cited 2020 Nov 1]. A language and environment for statistical computing–2019. Available from: <https://www.r-project.org/>
20. The R Foundation [homepage on the Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; [cited 2020 Nov 1]. Integrated Development for R–2020. Available from: <https://www.rstudio.com/>
21. Guarize J, Casiraghi M, Donghi S, Casadio C, Diotti C, Filippi N, et al. EBUS-TBNA in PET-positive lymphadenopathies in treated cancer patients. *ERJ Open Res.* 2017;3(4):00009-2017. <https://doi.org/10.1183/23120541.00009-2017>
22. Gridelli C, Ardizzoni A, Barberis M, Cappuzzo F, Casaluce F, Danesi R, et al. Predictive biomarkers of immunotherapy for non-small cell lung cancer: results from an Experts Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(3):373-386. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.05.09>
23. Malhotra J, Jabbour SK, Aisner J. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer [published correction appears in *Transl Lung Cancer Res.* 2017 Oct;6(5):612]. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(2):196-211. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.03.01>
24. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):499-519. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.107>
25. Arriola AGP, Bashover E, Joseph C, Staerkel G, Wang WL, Roy-Chowdhuri S. The usefulness of various cytologic specimen preparations for PD-L1 immunostaining in non-small cell lung carcinoma. *J Am Soc Cytopathol.* 2018;7(6):324-332. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2018.07.005>
26. 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. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000540>