

GESTIÓN DE MUESTRAS CITOLÓGICAS EBUS-TBNA PARA PRUEBAS MOLECULARES INTEGRALES EN CÁNCER DE PULMÓN

Vega-Legorburu Naiara¹; Alòs Silvia¹; Esteve Roser¹; Lopez Ingrid; Alonso Paula³; Martínez Daniel^{1,4}.

¹Sección de Citología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.; ²Sección de Inmunohistoquímica, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.; ³Sección de Molecular, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.; ⁴Unidad Funcional de Tumores Torácicos.

ABSTRACT

Introducción: Los biomarcadores son una herramienta indispensable en el tratamiento personalizado del cáncer de pulmón de célula no pequeña (CCNP) avanzado. Su diagnóstico y estadificación se sustenta, mayoritariamente, en muestras citológicas de aspiración con aguja transbronquial por ultrasonido endobronquial. Debido al incremento de biomarcadores, la óptima gestión del material citológico es indispensable para garantizar un estudio molecular completo y de calidad.

Objetivo: Optimizar el tiempo de respuesta y la gestión del material citológico en pacientes con CCNP avanzado para garantizar un estudio molecular e inmunohistoquímico que permita tratamientos personalizados en estos pacientes.

Metodología: Valoración in situ de las muestras obtenidas mediante punción aspiración con aguja fina en pacientes con sospecha o diagnóstico previo de cáncer de pulmón avanzado. Se realizó diagnóstico preliminar, evaluación de la calidad de la extensión citológica y recogida de material para posteriores estudios moleculares. Las muestras se conservaron sin montar dentro de recipientes porta-laminillas, para una mejor preservación del ADN celular. Tras el diagnóstico se realizó estudio molecular y/o inmunohistoquímico con el mejor material.

Conclusión: La gestión integral de las muestras citológicas mediante ROSE es indispensable para garantizar el estudio molecular e inmunohistoquímico óptimo que permita la identificación de pacientes con CCNP candidatos a tratamientos personalizados.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la neoplasia maligna más común en todo el mundo y sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CCNP) constituye el 85% de todos los cánceres de pulmón y el 60% de ellos se diagnostican en estadios avanzados con una mediana supervivencia a cinco años del 15%. [1] Sin embargo, el uso de biomarcadores predictivos para terapias dirigidas específicas e inmunoterapias surgidos en las últimas décadas han aumentando la supervivencia de los pacientes con CCNP en estadios avanzados. [2]

El perfil genómico es ahora parte de la evaluación diagnóstica estándar rutinaria para pacientes con cáncer de pulmón avanzado. La necesidad de impulsar las decisiones de tratamiento en la práctica clínica ha incrementado la demanda de pruebas genéticas en el cáncer de pulmón, haciendo que los enfoques múltiples sean cada vez más necesarios para permitir el estudio de varios genes al mismo tiempo. [3,4]

Aunque la biopsia todavía se considera el gold standard para los estudios genéticos, [5,6] las pautas actuales de pruebas moleculares destacan que cualquier fuente de material, incluyendo muestras de citología, con celularidad tumoral adecuada, se pueden utilizar para el diagnóstico y/o pruebas de biomarcadores predictivos. [3,7] Esto pone de manifiesto la importancia de la pequeña biopsia y las muestras de citología, ya que representan, en hasta dos tercios de los pacientes, el único material para el diagnóstico. [8,9] La óptima gestión de este material es indispensable para garantizar un estudio molecular completo.

Esta situación nos llevó a investigar el rendimiento de las muestras citológicas obtenidas mediante punción endobronquial guiada por ultrasonido (EBUS-TBNA) para estudios moleculares así como PD-L1 en una serie de pacientes diagnosticados de CCNP en nuestra institución. Nuestro objetivo fue optimizar el tiempo de respuesta y la gestión del material citológico en pacientes con CCNP avanzado para realizar un estudio molecular e inmunohistoquímico de calidad que permitiera identificar dianas terapéuticas tratables en estos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio los pacientes del Hospital Clinic Barcelona, con sospecha de cáncer de pulmón, evaluados por el Servicio de Neumología, donde se evaluaron los diferentes diagnósticos y el estadiaje del tumor. Todos los casos fueron discutidos en el comité multidisciplinar de tumores torácicos, compuesto por varios profesionales involucrados en el diagnóstico y cuidado de pacientes con cáncer de pulmón. Se incluyeron prospectivamente en el estudio los pacientes sometidos a EBUS-TBNA con sospecha o diagnóstico confirmado de CCNP en estadio III o IV.

Los pacientes fueron estadificados con TNM de acuerdo con las guías de la 8ª edición de la AJCC Cancer Staging Manual.[10]

Rapid On-Site Evaluation (ROSE)

Los casos fueron evaluados en la sala de broncoscopia del Instituto Clínico Respiratorio por un citotecnólogo experto, mediante evaluación rápida in situ (ROSE). Por cada punción se realizó una tinción Diff-Quik para la evaluación de la cantidad y viabilidad de las células tumorales. Esta primera evaluación, servía para orientar al broncoscopista a realizar pases adicionales con el objetivo de obtener material suficiente para realizar un diagnóstico citológico y para garantizar un diagnóstico molecular. Se recogieron al menos 4 extensiones secadas al aire, teñidas con Diff-Quik, con una representación de más de 500 células tumorales por laminilla y, además, se realizaron pases adicionales para bloque celular. Las extensiones se transportaron a Anatomía Patológica sin montar, protegidas en una caja para su evaluación definitiva.

Tras el diagnóstico citológico por el equipo citopatólogo/citotecnólogo, el material de extensiones del EBUS-TBNA fue utilizado para realizar los análisis moleculares. Las muestras se conservaron sin montar dentro de recipientes porta-laminillas, para una

mejor preservación del ADN y ARN celular hasta su requerimiento para estudios moleculares por parte del Comité de Tumores Torácicos. Los bloques celulares se prepararon a partir de solución salina normal con Histogel® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

En cada intervención se procuró obtener suficiente celularidad tumoral para realizar tres técnicas diferentes: NGS (mutaciones de genes mediante estudio de ADN); nCounter (reordenamientos de genes mediante estudio de RNA y detección de la delección por splicing del exón 14 de MET (METex14)); e inmunohistoquímica (IHQ) para la expresión de PD-L1. Para NGS y nCounter solo se utilizaron únicamente el material de las extensiones mientras que para PD-L1 se utilizó exclusivamente el material del bloque celular.

Extracción de ADN y oncomine

La extracción de ADN y la NGS se realizaron con el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) y el kit Oncomine™ Solid Tumor DNA Panel (OST, ThermoFisher Scientific, Waltham, EE. UU.), respectivamente, ambos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 10 ng para generar librerías genómicas. El panel de ADN de tumores sólidos Oncomine™ cubre las mutaciones somáticas (sustituciones, inserciones, delecciones e inversiones) en 22 genes, incluidos EGFR, ALK, ERBB2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, DDR2, KRAS, PIK3CA, BRAF, AKT1, PTEN, NRAS, MAP2K1, STK11, NOTCH1, CTNNB1, SMAD4, FBXW7 y TP53. Los amplicones se cubrieron en promedio hasta un mínimo de 500X. Para considerar adecuadas las muestras para NGS, las células tumorales deben comprender al menos el 20 % de las células de la muestra y con un mínimo de 300 células tumorales.

Extracción de ARN y nCounter

El ARN de las muestras de las extensiones citológicas se extrajo con un kit de aislamiento de ARN (Roche, Meylan, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total (10-200 ng) se hibridó con una mezcla personalizada para identificar las fusiones de genes ALK, ROS1, RET y NTRK1, y METex14. El procesamiento de muestras, la obtención de imágenes y el conteo se realizó mediante nCounter (NanoString Technologies Inc, Seattle, WA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se consideraron aptas para el análisis si contenían un mínimo de 500 células en total con al menos un 10 % de células tumorales.

Inmunohistoquímica de PD-L1

La inmunohistoquímica (IHQ) se realizó en secciones de tejido fijadas con formalina y desparafinadas de cuatro micras utilizando el ensayo PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako, Glostrup, Dinamarca; en un Dako Autostainer Link 48), con tejido de amígdalas humanas como control. La expresión de PD-L1 en células tumorales se evaluó en función del porcentaje de PD-L1 positivo con patrón de tinción de membrana. Los casos se clasificaron según el Tumor Proportion Score (TPS) de la siguiente manera: negativos (0 y <1%); positivo bajo (1–49 %); y positivo alto (50-100%). Se evaluó un mínimo de 100 células tumorales por muestra.[4]

RESULTADOS

Entre Febrero del 2018 y Mayo del 2021, se recogieron 193 muestras procedentes de 193 pacientes con CCNP mediante el procedimiento de EBUS-TBNA asistidos por ROSE en el Hospital Clínic de Barcelona. De estas muestras, finalmente se requirieron estudios moleculares (NGS, nCounter) y/o tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en 106 pacientes (54.92%).

De las 106 muestras analizadas, 58 (54.72%) mostraron alguna mutación genética driver. Cuatro muestras fueron no valorables para el estudio de Oncomine, y cinco fueron no valorables para nCounter. La alteración más frecuente fue la mutación de KRAS (24 casos) seguida de las mutaciones de EGFR (12 casos) y BRAF (7 casos). Se identificaron 2 reordenamientos de ALK, 2 de RET y 1 de NTRK. No se detectaron reordenamientos de ROS1. Además, mediante nCounter se detectaron 7 casos con la alteración METex14. Los resultados de las mutaciones se muestran en la Figura 1.

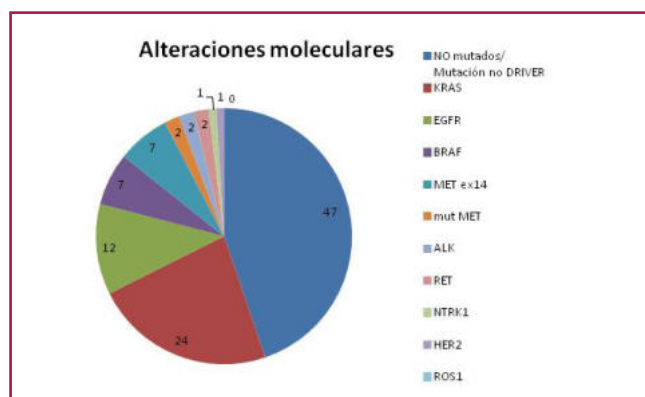


Figura 1. Resultado de las alteraciones moleculares en las muestras analizadas con los paneles de NGS: Oncomine™ Solid Tumor DNA Panel y nCounter.

La expresión de PD-L1 fue estudiada exclusivamente sobre material de bloque celular en 82 de los 106 casos. Las muestras con material insuficiente en el bloque no se consideraron aptas para estudio de PD-L1 22C3 pharmDx. Se observó un resultado positivo en más del 50 % de las células tumorales en 22 pacientes, un resultado entre 1-49% en 18 pacientes y un resultado negativo/<1% en 38.

DISCUSIÓN

El creciente énfasis en la medicina personalizada ha propiciado que los patólogos estén experimentando un aumento constante en el número de solicitudes de pruebas moleculares en muestras de pacientes con CCNP en estadios avanzados. El análisis molecular del material genético permite detectar aberraciones en los tumores que pueden predecir una respuesta a las terapias dirigidas. Por esta razón los test moleculares son cada vez más relevantes en pacientes con enfermedad avanzada. La obtención de material por medio de punción aspiración con aguja fina (PAAF) obtenidas mediante EBUS-TBNA son especialmente útiles en este sentido porque representan un medio rápido, eficaz y mínimamente invasivo para obtener muestras de estos pacientes. En consecuencia, los patólogos se enfrentan cada vez más a los retos de realizar más pruebas en especímenes más pequeños, tanto biopsia pequeña como muestra citológica.[11,12]

Los rápidos avances en terapias dirigidas en CCNP hacen que la optimización e implementación de estudios moleculares en muestras de citología sea una prioridad. Varios estudios ya han demostrado y validado la idoneidad de las muestras citológicas para pruebas moleculares.[13,14] Pero aunque estas muestras proporcionan un material con una alta calidad para el análisis molecular, la citopatología molecular no está aún estandarizada. [15]

La ROSE es un procedimiento que ayuda a superar las limitaciones de muestreo en citología. Además, permite garantizar en el mismo acto la suficiente cantidad de células tumorales para usarlas en plataformas genómicas de secuenciación masiva, que suelen requerir en torno a un 20% de células tumorales. En nuestra experiencia, la gestión integral del material del EBUS-TBNA mediante ROSE ha permitido agilizar el tiempo de diagnóstico y disminuir el número de reprogramaciones para el EBUS en comparación con las reprogramaciones de punciones radiológicas, que no están asistidas por una evaluación in situ.[16]

Otra ventaja de las extensiones citológicas es que el ADN es fácilmente extraíble, y de alta calidad incluso si se archiva durante un periodo prolongado.[17]

Algunos trabajos han comparado la concordancia de los estudios moleculares entre citología y biopsia, y han demostrado que el material de citología es tan bueno o mejor que la biopsia para las determinaciones moleculares. [18,19] Martín de León et al. recogieron veintinueve casos de CCNP que tenían muestra pareada de citología y de biopsia y compararon el estudio molecular hecho en ambos tipos de muestra. Entre las 23 muestras se observó plena concordancia en los resultados positivos y negativos entre ambos tipos de muestras, realizados tanto por OncoPrint como por nCounter. [18] Fielding et al. también investigaron el potencial de utilizar ADN extraído de extensiones citológicas teñidas con Diff-Quik frente a bloques celulares del procedimiento EBUS-TBNA y observaron que las extensiones proporcionan mayor cantidad de DNA (media de 434 ng para bloque celular y media de 1740 ng para extensiones) y además tienen un mejor rendimiento para la secuenciación (61% de rendimiento para los bloques celulares vs 81% para las extensiones). [19] En los resultados de nuestro estudio obtenemos unas proporciones de mutaciones en genes específicos que se asemejan a las observadas en los estudios en población real, lo que indicaría que los resultados moleculares obtenidos sobre muestras citológicas son fiables.

Respecto a los resultados de PD-L1 sobre material citológico, varios estudios han comparado el PD-L1 entre bloques celulares y biopsias, demostrando que puede ser evaluado de forma fiable en muestras citológicas permitiendo la identificación de candidatos a tratamiento con inmunoterapia. [18,20–22] Nuestros resultados van acorde con lo publicado, pudiendo evaluar PD-L1 en una gran mayoría de bloques

celulares. También existen algunos estudios que comparan el resultado de PD-L1 entre extensiones y biopsias en muestras pareadas. En el estudio de Roberto et al. se observa una concordancia del 74% con un coeficiente Kappa de 0.59 (acuerdo moderado). En este estudio la mayoría de tinciones se realizó sobre bloque celular (62%) y en menor medida sobre extensiones (38%), pero en los resultados de concordancia no se especifica el tipo de muestra.[18] Sin embargo, otros estudios sí han demostrado una muy buena correlación de la inmunocitoquímica de PD-L1 entre extensiones y biopsias con una concordancia que oscila entre el 90%-97%.[23–25] Algunos de estos artículos destacan la necesidad de establecer un estricto control de la fase preanalítica del procesamiento de muestras citológicas de cara a una estandarización de la evaluación de la expresión de PD-L1 en este tipo de muestras. [25,26]

CONCLUSIONES

El creciente número de biomarcadores predictivos disponibles para el tratamiento de pacientes con CCNP pone de manifiesto la necesidad de proporcionar resultados rápidos, fiables y rentables. Un diagnóstico certero en el momento adecuado, utilizando la menor cantidad de tejido posible, es el paradigma necesario para el establecimiento y desarrollo de la medicina de precisión en estos pacientes. Dado que la citología es la principal fuente de tejido en muchos de estos pacientes, la gestión integral de las muestras mediante ROSE, así como un control de la fase preanalítica, es crucial para la estandarización del manejo de la muestra, además de garantizar un estudio molecular e inmunohistoquímico óptimo que permita la identificación de candidatos a tratamientos personalizados. Por eso, la colaboración multidisciplinar entre los diferentes profesionales implicados para conseguir la máxima calidad en el proceso diagnóstico es de vital importancia para definir la mejor actitud terapéutica para cada paciente. ■

Bibliografía

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69:7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
2. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29:iv192–237. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>.
3. 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 a. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 142, *Arch Pathol Lab Med*; 2018, p. 321–46. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP>.
4. Teixidó C, Vilariño N, Reyes R, Reguart N. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2018;10. <https://doi.org/10.1177/1758835918763493>.
5. Jurado J, Saqi A, Maxfield R, Newmark A, Lavelle M, Bacchetta M, et al. The efficacy of EBUS-guided transbronchial needle aspiration for molecular testing in lung adenocarcinoma. *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 96, *Ann Thorac Surg*; 2013, p. 1196–202. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.05.066>.

6. Fernandez-Bussy S, Labarca G, Pires Y, Caviedes I, Burotto M. Análisis moleculares de EGFR, mutación de resistencia al EGFR, ALK y ROS1 en muestras obtenidas mediante PATB-USEB en Chile. *Arch Bronconeumol* 2017;53:172–4. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.08.013>.
7. Roy-Chowdhuri S, Dacic S, Ghofrani M, Illei PB, Layfield LJ, Lee C, et al. Collection and handling of thoracic small biopsy and cytology specimens for ancillary studies. *Arch Pathol Lab Med* 2020;144:933–58. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0119-CP>.
8. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AMC, Doooms C, Elmberger G, García RC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): Recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016;71:177–84. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206677>.
9. Roy-Chowdhuri S, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk A, Cagle PT, et al. Biomarker Testing in Lung Carcinoma Cytology Specimens: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140:1267–72. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2016-0091-SA>.
10. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Schilsky RL, Brookland RK, Washington MK, et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual*. 2017.
11. Azzoli CG, Temin S, Aliff T, Baker S, Brahmer J, Johnson DH, et al. 2011 Focused update of 2009 American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:3825–31. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.2774>.
12. Rekhman N, Brandt SM, Sigel CS, Friedlander MA, Riely GJ, Travis WD, et al. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol* 2011;6:451–8. <https://doi.org/10.1097/JTO.0B013E31820517A3>.
13. Malapelle U, Mayo De-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, et al. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer* 2017;116:802–10. <https://doi.org/10.1038/BJC.2017.8>.
14. Lozano MD, Echeveste JI, Abengozar M, Mejías LD, Idoate MA, Calvo A, et al. Cytology Smears in the Era of Molecular Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer: Doing More With Less. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142:291–8. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2017-0208-RA>.
15. Schmitt F, Lozano MD. Molecular/biomarker testing in lung cytology: A practical approach. *Diagn Cytopathol* 2023;51:59–67. <https://doi.org/10.1002/dc.25054>.
16. Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, Salas C, de Castro J, Conde E, et al. [New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology]. *Rev Esp Patol* 2023;56:97–112. <https://doi.org/10.1016/J.PATOL.2023.02.002>.
17. Knoepp SM, Roh MH. Ancillary techniques on direct-smear aspirate slides: a significant evolution for cytopathology techniques. *Cancer Cytopathol* 2013;121:120–8. <https://doi.org/10.1002/CNCY.21214>.
18. Martin-Deleon R, Teixido C, Ma Lucena C, Martinez D, Fontana A, Reyes R, et al. EBUS-TBNA Cytological Samples for Comprehensive Molecular Testing in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13092084>.
19. Fielding D, Dalley AJ, Bashirzadeh F, Singh M, Nandakumar L, McCart Reed AE, et al. Diff-Quik Cytology Smears from Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration Lymph Node Specimens as a Source of DNA for Next-Generation Sequencing Instead of Cell Blocks. *Respiration* 2019;97:525–39. <https://doi.org/10.1159/000495661>.
20. 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 AIMM* 2017;25:453–9. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000540>.
21. Heymann JJ, Bulman WA, Swinarski D, Pagan CA, Crapanzano JP, Haghghi M, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol* 2017;125:896–907. <https://doi.org/10.1002/cncy.21937>.
22. Russell-Goldman E, Kravets S, Dahlberg SE, Sholl LM, Vivero M. Cytologic-histologic correlation of programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung carcinomas. *Cancer Cytopathol* 2018;126:253–63. <https://doi.org/10.1002/CNCY.21973>.
23. Munari E, Zamboni G, Sighele G, Marconi M, Sommaggio M, Lunardi 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;127:52–61. <https://doi.org/10.1002/cncy.22083>.
24. Noll B, Wang WL, Gong Y, Zhao J, Kalhor N, Prieto V, et al. Programmed death ligand 1 testing in non-small cell lung carcinoma cytology cell block and aspirate smear preparations. *Cancer Cytopathol* 2018;126:342–52. <https://doi.org/10.1002/cncy.21987>.
25. Lozano MD, Abengozar-Muela M, Echeveste JI, Subtil JC, Bertó J, Gúrpide A, 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;127:470–80. <https://doi.org/10.1002/cncy.22155>.
26. Roy-Chowdhuri S. Immunocytochemistry of cytology specimens for