

EL QUE ENS CAL SABER DE PD-L1 EN CITOLOGIA.

M. Carme Dinarès Fernández; Irene Sansano Valero.

Servei d'Anatomia Patològica; Hospital Universitari Vall d'Hebron; Barcelona

1. Introducció

El desenvolupament d'un càncer no és un fenomen que es doni de la nit al dia. En concret, per el càncer de pulmó sabem que calen diferents factors i el risc més gran perquè es desenvolupi, amb diferència, és el tabaquisme però, l'edat, l'exposició al radó, la contaminació ambiental, l'exposició laboral, el gènere, la raça i les malalties pulmonars preexistents també són factors importants a tenir en compte. Tanmateix, no totes les persones amb aquests factors de risc pateixen un càncer de pulmó, i algunes sense cap factor de risc conegut ho fan, cosa que indica la importància de les influències genètiques (1). Tots aquests factors actuaran en la iniciació, promoció i progressió de la neoplàsia que a nivell histològic esdevé evident en els canvis que pateixen cèl·lules i teixits com són: la hiperplàsia, displàsia, carcinoma in situ (lesions pre invasives) i el carcinoma invasor. Així doncs s'estableixen com a lesions pre invasives de l'adenocarcinoma, la hiperplàsia adenomatosa atípica i l'adenocarcinoma in situ i per el carcinoma escamós serien la displàsia de cèl·lules escamoses i el carcinoma escamós in situ (2).

Els distintius de la gènesis tumoral són les capacitats adquirides de cèl·lules, individuals o en grups, necessàries per la transformació en una entitat maligna. Cada neoplàsia les adquireix mitjançant diferents mecanismes i en diferents moments durant el curs evolutiu esglaonat del desenvolupament tumoral. Aquestes habilitats han estat descrites per Hanahan i Weinberg com: la insensibilitat als senyals anticreixement, l'autosuficiència en els senyals de creixement, evasió de l'apoptosi, el potencial replicatiu il·limitat, l'angiogènesi sostinguda, la invasió tissular i metastasi, la de modificar o "reprogramar el metabolisme cel·lular" i l'evasió de la destrucció pel sistema immune. A part d'aquestes, la "inestabilitat genòmica", és la base amb què els tumors aconsegueixen dotar-se d'aquestes capacitats, i la "inflamació" les promou (3, 4). Aquest procés està influït per una complexa interacció de genètica, conducta i factors ambientals, que poden augmentar el risc d'una persona a desenvolupar càncer.

L'heterogeneïtat molecular és un esdeveniment freqüent en càncer i és responsable de diversos problemes crítics en el diagnòstic i tractament dels pacients oncològics. Els tumors pulmonars es caracteritzen per tenir un alt grau d'heterogeneïtat molecular, associada a diferents mecanismes com la genètica, l'epigenètica i la no genètica. Es reconeixen diferents nivells d'heterogeneïtat en càncer: interpacients, que està relacionada amb la genètica i variacions fenotípiques, observades entre individus amb el mateix tipus de tumor; intratumoral, que fa referència a la diversitat subclonal de cèl·lules tumorals observades dins d'un mateix tumor; i la intertumoral, que és la diversitat entre tumor primari i les seves metastasis (5).

El carcinoma de cèl·lula no petita (NSCLC) és un dels tumors amb major taxa de mutacions. Els estudis de seqüenciació massiva (NGS) han demostrat un ampli espectre d'alteracions genètiques en NSCLC i un perfil genètic diferent segons el tipus histològic. Una mutació "driver" està causalment relacionada amb el desenvolupament del càncer i apuntar a un "inhibidor" específic per a aquesta mutació representa generalment una estratègia terapèutica amb èxit. Representen un punt clau en la gènesis tumoral i el tractament farmacològic amb inhibidors específics. En el NSCLC actualment es coneixen varies d'aquestes alteracions genètiques que tenen un fàrmac diana específic (6) (veure imatge 1). Per aquest motiu les guies recomanen la identificació de biomarcadors en pacients amb NSCLC entre els quals hi trobem PD-L1. Aquests biomarcadors essencials són: EGFR, ALK, ROS1, BRAF V600E, PD-L1, NTRK, RET, KRAS i MET (7).

2. Patologia molecular en citologia, aspectes a tenir en compte.

La majoria de pacients amb NSCLC reben el diagnòstic en estadis avançats i per aquest motiu, en molts casos, es prefereix l'ús de tècniques mínimament invasives per obtenir una mostra del tumor, per això sovint la base del diagnòstic són mostres de citologia que jugarà un paper important en : diagnòstic, pronòstic, i en la informació de maneig de pacients.

Per tant, ens cal saber quin tipus de mostres citològiques utilitzem, com les hem de processar, quins són els factors pre-analítics que afecten els àcids nucleics i els resultats de les proves moleculars i quins són els tests moleculars més adequats aplicables a mostres de citologia (8).

Pel diagnòstic de càncer de pulmó s'utilitzen dos tipus de mostres citològiques:

- Citologia Exfoliativa: esput, bronc aspirat, rentat bronc alveolar, raspallat bronquial i líquid pleural.
- Citologia per punció aspiració amb agulla fina (PAAF): de lesions pulmonars, d'adenopaties mediastíniques i para hilars i de lesions metastàtiques (os, glàndules suprarenals, teixit subcutani, etc).

Un bon maneig en el processament d'aquestes mostres ens permetrà controlar les variables pre analítiques, que tenen un efecte important de cara a l'obtenció de bons resultats de les tècniques complementàries com les de biologia molecular. Cada tipus de processament presenta uns avantatges i uns inconvenients alhora de realitzar tests moleculars i s'han de conèixer per poder escollir el tipus de mostra i processament més adequats al test que vulguem utilitzar (8). Algunes guies ja indiquen que els frotis directes assecats a l'aire o fixats en etanol i la citologia en base líquida són adequats per proves moleculars (9).

3. Què és PD-L1?

El PD-L1 és un receptor transmembrana que de manera fisiològica actua com a punt de control immunitari per prevenir atacs immunològics nocius als autoantígens durant una resposta immune. Així doncs, la resposta immune queda frenada per mecanismes de senyalització intracel·lulars que regulen negativament les cèl·lules immunes efectores induint la regressió i esgotament de les cèl·lules T. Aquesta proteïna s'expressa en molts tipus de cèl·lules com, les cèl·lules presentadores d'antígens (APC), els limfòcits T i B, els monòcits i les cèl·lules epitelials (10).

PD-L1 s'activa en resposta a les citocines pro inflamatòries, aquestes cèl·lules augmenten l'expressió de PD-1. La unió de PDL1 a PD-1 activa la via de senyalització per sota del receptor de PD-1 a les cèl·lules T, inhibint així la proliferació, generació, alliberament i citotoxicitat de citocines de cèl·lules T (10).

Regulant l'expressió PD-L1, alguns tumors utilitzen d'aquesta via com a mecanisme per desactivar els punts de control immunitari, per tant, escapar a les respostes immunitàries antitumorals (10).

L'expressió de PD-L1 a la superfície cel·lular tumoral està subjecte a diversos processos biològics:

- Per inducció de l'expressió a través de les cèl·lules T que infiltrin el tumor
- Manca d'expressió reactiva de PD-L1 per l'absència de cèl·lules T
- Mecanismes genètics també poden determinar l'expressió constitutiva de PD-L1.
- Esdeveniments genètics dins de les cèl·lules tumorals que impedeixen l'expressió de PD-L1 després de la infiltració de cèl·lules T.

La presència o absència de PD-L1 en les cèl·lules tumorals pot tenir diferents funcionalitats i implicacions terapèutiques segons el mecanisme d'expressió subjacent. El desenvolupament d'inhibidors del punt de control immunitari ha transformat el paradigma del tractament dels càncers avançats en molts tipus de tumors (10).

Els fàrmacs d'immunoteràpia bloquegen la unió de les proteïnes del punt de control amb les seves proteïnes associades, evitant la inactivació de les cèl·lules T i permetent-les actuar enfront les cèl·lules canceroses per eliminar-les. Des del 2011 la FDA ha aprovat diversos fàrmacs dirigits a PD-1 o PD-L1: Ipilimumab (2011) per tractar el melanoma com a inhibidor de CTLA 4 (Bristol-Myers Squibb) i Pembrolizumab (2014) primer anticòs anti-PD-1, (Merck) per al melanoma metastàtic. Alguns d'aquests nous fàrmacs bloquegen PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab) metres que altres inhibeixen PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) (10).

4. Com es valora PD-L1?

La immunoteràpia és molt cara i pot tenir efectes secundaris importants, per aquest motiu és imprescindible avaluar l'expressió de PD-L1 tumoral abans de l'inici del tractament ja que només els pacients amb una alta expressió tumoral de PD-L1 poden beneficiar-se del seu ús.

PDL1 EN CITOLOGIA, TEORIA I CASOS PRÀCTICS

Per predir quin pacient pot ser tributari d'aquest tractament es valora l'expressió de la proteïna PD-L1 en cèl·lules tumorals o immunitàries resultant un biomarcador predictiu de la sensibilitat a la immunoteràpia. La immunohistoquímica és l'única tècnica àmpliament disponible, pràctica i econòmica per estudiar l'expressió PD-L1 tumoral.

S'utilitzen diferents plataformes immunohistoquímiques amb diversos anticossos PD-L1 per avaluar l'expressió de PDL1 a cèl·lules tumorals, cèl·lules inflamatòries intratumorals o ambdues. Els assaigs registrats a la FDA van utilitzar quatre anticossos diferents de PD-L1 (22C3, 28-8, SP263, SP142), disponibles com a kits preempaquetats per utilitzar-los amb la seva plataforma aprovada (Dako i Ventana). (11, 12, 13)

Les condicions pre analítiques òptimes requerides en la mostra per tal que els resultats de la prova siguin fiables es troben recollides a la taula 1.

La positivitats de PD-L1 es valora segons el percentatge d'expressió en cèl·lules tumorals viables i es considera positiu quan s'observa expressió de membrana citoplasmàtica (parcial lineal o circumferencial) amb qualsevol intensitat (10).

5.PD-L1 en citologia.

Hi ha varies publicacions en la literatura que fan referència a PD-L1 en citologia (11, 14-17). En la majoria d'elles es fa referència al l'ús del bloc cel·lular com a mostra citològica y es fan revisions i recomanacions de les fases pre analítica, analítica i post analítica per a la optimització dels resultats.

5.1. Consideracions de la fase pre-analítica.

No hi ha estudis que demostrin que el diàmetre de les agulles afecti significativament l'adequacitat de la mostra per fer el PD-L1. Es fa èmfasis en l'ús de la valoració in situ de les puncions (ROSE) per augmentar el rendiment de la mostra aspirada pel PD-L1.

Paràmetre	Condicions Òptimes
Tipus de mostra	Biòpsia petita, peça resecció, bloc cel·lular. PD-L1 pot validar-se en mostres de citologia.
Preparació	Seccions de 3-5 micres muntades en portaobjectes pretractats.
Temps d'isquèmia freda	< 30 minuts
Fixador	Formol tamponat al 10%
Ratio Fixador/Teixit	10:1
Temps de fixació	6-48 hores per biòpsies petites i blocs cel·lulars. 24-48 hores per peces de resecció (acceptable fins 72 hores).
Temps de emmagatzematge per talls en blanc	Menys de 2 mesos. Acceptable > 12 mesos a 2°C-8°C.
Temps de emmagatzematge per blocs de parafina	Menys de 3 anys Acceptable fins a 5 anys
Condicions d'emmagatzematge per talls en blanc i blocs de parafina	En un lloc apartat de la llum, la calor (temperatura recomanable de 2°C-8°C) i la humitat.
Representació de cèl·lules tumorals	>100 cèl·lules tumorals

Taula 1. Condiciona pre analítiques òptimes per la immunohistoquímica de PD-L1. Taula adaptada de Lantuejoul S. Journal of Thoracic Oncology 15,4: 499-519 (12)

La taxa d'adequació de mostres citològiques és generalment >80% i ocasionalment <70% (15). Les mostres citològiques més utilitzades són el bloc cel·lular seguit de frotis directes (sense tenyir, assecats a l'aire o fixats en alcohol), cito spins i extensions de citologia líquida.

En referència al bloc cel·lular, la varietat de mètodes amb què es preparen, pot afectar el rendiment de la immunohistoquímica de PD-L1 i es recomana que el fixador d'elecció per aquesta mostra sigui el formol tamponat al 10%. D'altra banda, no hi ha estudis que analitzin la viabilitat de la ICC PD-L1 en mostres citològiques antigues (14).

5.2. Consideracions de la fase analítica

Es considera que una mostra és adequada per realitzar el PD-L1 quan presenta un mínim de 100 cèl·lules viables i ben conservades. Els estudis han demostrat que les taxes de concordança varien de forma directament proporcional a la cel·lularitat present dels exemplars de citologia (11).

La valoració del resultat i els sistemes de puntuació són iguals als del PD-L1 en biòpsies però els estudis que exploren l'efecte dels diferents clons en la interpretació de PD-L1 en citologia són limitats (11).

Com a controls positius externs la placenta i les amígdales són els teixits més comunament utilitzats tot i que alguns investigadors utilitzen línies cel·lulars comercials mentre es desenvolupen protocols per expressió de PD-L1 en mostres citològiques.

La variabilitat entre observadors és generalment més gran en mostres citològiques que en biòpsies petites i peces de resecció quirúrgica. Aquest resultat suggereix que la interpretació de PD-L1 en mostres citològiques és més difícil. Les principals dificultats poden atribuir-se a que en les extensions citològiques hi haurà més tinció inespecífica de fons; més dificultat en diferenciar les cèl·lules tumorals de les benignes, inclosos els macròfags; i que la disposició cel·lular sol ser més discòhesiva. Tot això fa que es requereixi una experiència considerable i una formació especialitzada per decidir si una mostra citològica és adequada per valoració de PD-L1 (11).

En quan a la correlació cito-histològica, els estudis han demostrat una correlació molt variable (53-100%) i només estan fets en mostres de bloc cel·lular. Algunes de les consideracions a tenir en compte en relació a aquests resultats són la heterogenicitat intratumoral,

la variabilitat en la cel·lularitat i la presència de major nombre de grups cel·lulars tridimensionals en les mostres de citologia. La reproductibilitat intra i inter observador, malgrat és bona, només s'ha avaluat en mostres de bloc cel·lular (11).

5.3. Consideracions de la fase post analítica

Els estudis que analitzen l'impacte real de la anàlisi de PD-L1 sobre mostres de citologia amb el seu "cut-off", en qualsevol fàrmac d'immunoteràpia, i la seva correlació amb els resultats clínics són limitats (11).

Per casos NSCLC, l'Associació Internacional per a l'Estudi del Càncer de Pulmó (IASCL) requereix protocols en mostres de citologia que estiguin totalment validats i sotmesos a mesures de control de qualitat (15).

CONCLUSIONS

Les mostres de citologia (frotis, bloc cel·lular, citologia líquida) són fonts valuoses per a tècniques auxiliars sempre que es faci una validació acurada de les mostres. Són una font fiable per a l'anàlisi immunohistoquímic de PD-L1 i queda demostrat per la remarcable adequació de la mostra i la taxa de concordança observada entre les mostres citològiques i histològiques.

A més a més, el fet que els fixadors citològics no comprometin la tinció de PD-L1 demostra encara més la utilitat de les mostres citològiques per a les proves de PD-L1 en la pràctica clínica habitual.

Malgrat tot, hi ha alguns reptes que encara s'han d'abordar com: proporcionar programes de formació per garantir l'avaluació de l'adequació i la gestió adequada de les mostres; validar i estandarditzar els protocols de processament de mostres citològiques entre els laboratoris i establir directrius d'estandardització per a la prova PD-L1 de mostres de citologia que abordin paràmetres pre analítics, analítics i post analítics.

Finalment, no es pot subestimar el valor de l'experiència dedicada en la interpretació del diagnòstic en la citologia i de PD-L1 en mostres citològiques. ■

Bibliografia

- 1) de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am.* 2012 Sep;50(5):863-76. doi: 10.1016/j.rcl.2012.06.006. PMID: 22974775.
- 2) 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 Feb;6(2):244-85. doi: 10.1097/JTO.0b013e318206a221. PMID: 21252716; PMCID: PMC4513953.
- 3) Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70
- 4) Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-674
- 5) Zito Marino F, Bianco R, Accardo M, Ronchi A, Cozzolino I, Morgillo F, Rossi G, Franco R. Molecular heterogeneity in lung cancer: from mechanisms of origin to clinical implications. *Int J Med Sci.* 2019 Jun 10;16(7):981-989. doi: 10.7150/ijms.34739. PMID: 31341411; PMCID: PMC6643125.
- 6) Araghi M, Mannani R, Heidarnajad Maleki A, Hamidi A, Rostami S, Safa SH, Faramarzi F, Khorasani S, Alimohammadi M, Tahmasebi S, Akhavan-Sigari R. Recent advances in non-small cell lung cancer targeted therapy; an update review. *Cancer Cell Int.* 2023 Aug 11;23(1):162. doi: 10.1186/s12935-023-02990-y. PMID: 37568193; PMCID: PMC10416536.
- 7) Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, Salas C, de Castro J, Conde E, Felip E, Gómez-Román J, Garrido P, Enguita AB. 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. *Clin Transl Oncol.* 2023 May;25(5):1252-1267. doi: 10.1007/s12094-022-03046-9. Epub 2022 Dec 26. Erratum in: *Clin Transl Oncol.* 2023 Feb 8;: PMID: 36571695; PMCID: PMC10119050.
- 8) Jain D, Roy-Chowdhuri S. Molecular Pathology of Lung Cancer Cytology Specimens: A Concise Review. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Sep;142(9):1127-1133. doi: 10.5858/arpa.2017-0444-RA. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29547001
- 9) Garrido P, Conde E, de Castro J, Gómez-Román JJ, Felip E, Pijuan L, Isla D, Sanz J, Paz-Ares L, López-Ríos F. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2020 Jul;22(7):989-1003. doi: 10.1007/s12094-019-02218-4. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31598903; PMCID: PMC7260262.
- 10) Akhtar M, Rashid S, Al-Bozom IA. PD-L1 immunostaining: what pathologists need to know. *Diagn Pathol.* 2021 Oct 25;16(1):94. doi: 10.1186/s13000-021-01151-x. Erratum in: *Diagn Pathol.* 2022 Jun 11;17(1):50. PMID: 34689789; PMCID: PMC8543866.

- 11) Satturwar S, Girolami I, Munari E, Ciompi F, Eccher A, Pantanowitz L. Program death ligand-1 immunocytochemistry in lung cancer cytological samples: A systematic review. *Diagn Cytopathol*. 2022 Jun;50(6):313-323. doi: 10.1002/dc.24955. Epub 2022 Mar 16. PMID: 35293692; PMCID: PMC9310737.
- 12) Lantuejoul S. *Journal of Thoracic Oncology* 15;4: 499-519 <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.107>
- 13) Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, Richardson W, Towne P, Hanks D, Vennapusa B, Mistry A, Kalamegham R, Averbuch S, Novotny J, Rubin E, Emancipator K, McCaffery I, Williams JA, Walker J, Longshore J, Tsao MS, Kerr KM. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol*. 2017 Feb;12(2):208-222. doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.2228. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27913228.
- 14) Tejerina E, Garca Tobar L, Echeveste JI, de Andrea CE, Vigliar E, Lozano MD. PD-L1 in Cytological Samples: A Review and a Practical Approach. *Front Med (Lausanne)*. 2021 May 7;8:668612. doi: 10.3389/fmed.2021.668612. PMID: 34026795; PMCID: PMC8139418
- 15) Iaccarino A, Salatiello M, Migliatico I, De Luca C, Gagnano G, Russo M, Bellevicine C, Malapelle U, Troncone G, Vigliar E. PD-L1 and beyond: Immuno-oncology in cytopathology. *Cytopathology*. 2021 Sep;32(5):596-603. doi: 10.1111/cyt.12982. Epub 2021 May 6. PMID: 33955097; PMCID: PMC8453493.
- 16) Lozano MD, Abengozar-Muela M, Echeveste JI, Subtil JC, Bertó J, Gúrpide A, Calvo A, de Andrea CE. 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 Jul;127(7):470-480. doi: 10.1002/cncy.22155. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31245924.
- 17) Polanco D, Pinilla L, Gracia-Lavedan E, Gatiús S, Zuñil M, Pardina M, Gómez S, Barbé F. Performance of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration as the first nodal staging procedure for the determination of programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023 Oct;149(13):12459-12468. doi: 10.1007/s00432-023-05039-9. Epub 2023 Jul 14. PMID: 37450028.
- 18) Tajaremmuang P, Aliaga F, Alwakeel AJ, Tavaziva G, Turner K, Menzies D, Wang H, Ofiara L, Benedetti A, Gonzalez AV. Accuracy of Cytologic vs Histologic Specimens for Assessment of Programmed Cell Death Ligand-1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest*. 2024 Feb;165(2):461-474. doi: 10.1016/j.chest.2023.09.013. Epub 2023 Sep 20. PMID: 37739030.