



NSCLC - RUOLO DEL PATOLOGO

169

RUOLO DEL PATOLOGO NELL'ERA DELLE
TERAPIE PERSONALIZZATE

NSCLC - RUOLO DEL PATOLOGO RUOLO DEL PATOLOGO NELL'ERA DELLE TERAPIE PERSONALIZZATE

Nell'era delle terapie personalizzate, il patologo sta assumendo sempre più un ruolo rilevante anche in considerazione dell'incremento di marcatori biomolecolari utili alla selezione della più efficace terapia dei pazienti in stadio avanzato di malattia

In questo scenario, sta emergendo la consapevolezza dell'importanza di disporre di adeguato materiale biologico per raggiungere sia un'accurata definizione istologica delle neoplasie e sia un completo profilo biomolecolare [1].

Seguendo i criteri stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Salute (WHO), gli istotipi prevalenti di carcinoma del polmone sono rappresentati dal carcinoma squamoso (SQC), l'adenocarcinoma (ADC) ed il carcinoma a piccole cellule (SCC) [2].

Inizialmente, i protocolli chemioterapici si basavano esclusivamente sulla differenziazione cito/istologica tra il carcinoma a piccole cellule e tutti gli altri istotipi, globalmente inseriti in un'unica, eterogenea categoria, definita carcinoma non a piccole cellule (NSCLC) [3-4].

Nel 2008, l'introduzione di nuovi agenti chemioterapici e di farmaci biologici dimostratisi efficaci in specifiche categorie di NSCLC [5-8] ha rilevato l'importanza di un'accurata definizione istologica delle neoplasie polmonari [9-11].

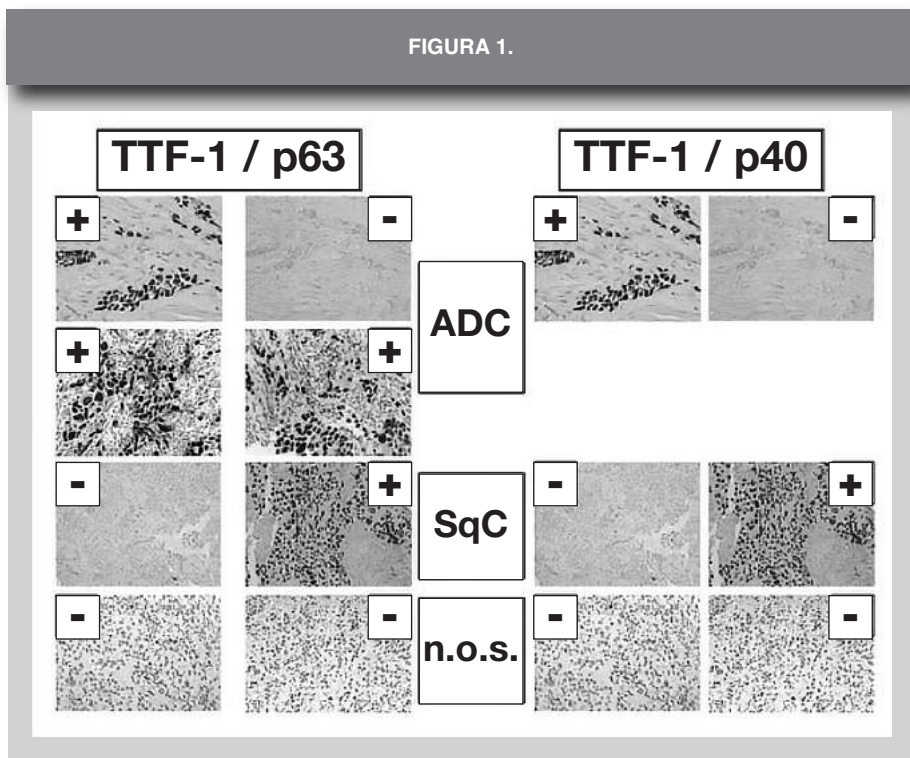
In oltre il 70% dei casi, il carcinoma del polmone si manifesta in uno stadio avanzato di malattia non rendendo il paziente, quanto meno inizialmente, eleggibile per terapia chirurgica. Anche in considerazione dello sviluppo di procedure diagnostiche interventistiche sempre meno invasive, il materiale biologico ottenibile per la tipizzazione della neoplasia, è rappresentato generalmente da piccole biopsie o da campioni esclusivamente citologici che ne rendono mandatoria un'accurata ed efficace gestione e manipolazione [12].

In circa il 50-70% dei casi, una definizione di istotipo di un campione citologico o piccola biopsia è raggiungibile su esclusiva base morfologica ed una oculata e circostanziata caratterizzazione immunohistochimica potrebbe inoltre ridurre al 5-10% la diagnosi generica di NSCLC [2].

In questo scenario, esclusivamente in assenza di una chiara differenziazione morfologica [13], un limitato pannello di anticorpi quali il thyroid tran-

scription factor-1 (TTF-1) e p40 potrebbe favorire rispettivamente una diagnosi di adenocarcinoma o di carcinoma squamoso [14-17]. Anche la Napsina A è un anticorpo frequentemente osservato nell'adenocarcinoma, ed ulteriori anticorpi a favore di una differenziazione squamosa sono rappresentati dalle citocheratine CK5/6 e da p63, anche se quest'ultima può essere espressa da un terzo circa degli adenocarcinomi [18]. In definitiva, in occasione di una diagnosi di carcinoma polmonare in cui non siano soddisfatti i soli criteri morfologici di differenziazione e con la contemporanea necessità di risparmiare il campione per le analisi molecolari, è raccomandabile l'impiego di tecniche istochimiche volte a determinare eventuale mucosecrezione ed immunoistochimiche che comprendano almeno uno, ma non più di due marcatori di differenziazione ghiandolare e squamosa [11] (**Figura 1**).

FIGURA 1.



E' opportuno inoltre rammentare che, esclusivamente in caso di caratteri morfologici di differenziazione neuroendocrina, ne è suggerita la dimostrazione mediante caratterizzazione immunostochimica con anticorpi anti-sinaptofisina, cromogranina e/o CD56 [2].

L'impiego della caratterizzazione immunofenotipica potrebbe essere di particolare aiuto nei casi in cui si abbia disponibilità di materiale diagnostico esclusivamente sotto forma di campioni citologici da agoaspirazione o di provenienza dalle sierose. In tali occasioni, parallelamente alla possibilità di rilevare l'espressione antigenica di differenti marcatori direttamente sui preparati citologici, l'utilizzo della tecnica del cell block [19] permette la concentrazione e l'inclusione in paraffina del materiale citologico, offrendo la possibilità di uno studio morfofenotipico del tutto sovrapponibile a quello impiegato su campioni tissutali.

E' da tener presente come la scelta e la valutazione dei differenti marcatori immunostochimici sia da effettuarsi in base alla disponibilità ed all'esperienza di ciascun laboratorio e si fondi sull'approfondita conoscenza da parte del patologo dei limiti delle tecniche adottate e dei caveat intrinseci a ciascun anticorpo.

Con l'avvento delle più recenti terapie basate su farmaci biologici, sempre maggiore rilievo ha assunto l'appropriata conservazione del materiale biotico o citologico da cui trarre informazioni critiche per il trattamento oncologico personalizzato dei pazienti affetti da carcinoma del polmone.

In caso di carcinoma polmonare metastatico, uno dei compiti più importanti affidato al patologo è quello di assicurare che ciascun campione diagnostico sia sottoposto alle analisi biomolecolari utili per la determinazione della strategia terapeutica maggiormente efficace.

In tutti i casi di NSCLC in stato avanzato di malattia, dopo aver assicurato la diagnosi e tentato di definirne l'istotipo, il patologo dovrebbe comprovare e riferire circa l'adeguatezza del campione per i test molecolari in termini di percentuale di cellule neoplastiche vitali in esso presenti. Un ulteriore contributo è offerto dal patologo anche nella individuazione e nella scelta del campione diagnostico maggiormente appropriato da indirizzare per i test molecolari. Infatti, gran parte del materiale biologico diagnostico di carcinoma polmonare è rappresentato da campioni tissutali usualmente fissati in formalina ed inclusi in paraffina, ottimi per l'analisi morfologica ed immunostochimica, ma in cui l'integrità degli acidi nucleici da sottoporre ad estrazione per i test molecolari può risultare compromessa.

In caso di disponibilità ed adeguatezza, il patologo dovrebbe preferire e destinare alle analisi molecolari i campioni citologici che generalmente

sono fissati in soluzioni a base di alcool e pertanto ottimali per la preservazione degli acidi nucleici [20, 21].

Nell'ambito delle alterazioni molecolari da ricercare, prevalentemente nell'istotipo adenocarcinoma e preferenzialmente nei pazienti non fumatori, vi sono le mutazioni attivanti del gene dell'epidermal growth factor receptor (EGFR) contro le quali sono stati sviluppati farmaci inibitori delle tirosin chinasi (TKI) [22-24], attualmente in grado di superare anche le forme di resistenza acquisita rappresentate principalmente dalla mutazione somatica T790M a carico dell'esone 20 del gene EGFR [25-30]. Contestualmente alla ricerca delle mutazioni attivanti del gene EGFR, un campione biptico o citologico diagnostico di adenocarcinoma o di NSCLC deve essere sottoposto alla ricerca di traslocazione o delezione del gene ALK [31, 32]. La presenza di questa alterazione molecolare può essere agevolmente determinata mediante analisi immunocitochimica [33, 34]: sono disponibili sia kit certificati associati a specifiche piattaforme di immunocolorazione e sia differenti anticorpi indipendenti dalle piattaforme. In quest'ultimo caso il patologo deve specificare il grado di immunoreattività (scala da 0 a 3+) in cui 0 corrisponde a negativo, 3 a positivo ed 1 e 2 a valori che necessitano di validazione mediante metodica di ibridizzazione fluorescente in situ (FISH) che potrà assicurare o meno la presenza di eventuale traslocazione e/o delezione [35, 36]. Molto recentemente, anche in Italia, è stata codificata la necessità che sia ricercato il riarrangiamento del gene ROS1 in tutti i pazienti affetti da adenocarcinoma metastatico [37].

In considerazione della relativa rarità dell'alterazione genica di ROS1, anche in questo caso è suggeribile adottare uno screening immunocitochimico con anticorpo specifico e, in caso di risultato dubbio, validarlo con metodica FISH [38, 39]. Allo stato attuale non esistono farmaci rimborsati in prima linea al di fuori di quelli volti ad inibire i driver molecolari EGFR, ALK, ROS1 e BRAF. Tuttavia, esiste la possibilità di accedere a farmaci per linee successive, o nell'ambito di trials clinici, volti ad inibire nuovi target emergenti nel NSCLC, quali MET, RET, NTRK, HER2 (al momento della stesura delle presenti linee guida ancora non disponibili in Italia studi per KRAS G12C)[40]. In quest'ottica, è sempre più raccomandata la valutazione di un pannello genico ampio, possibilmente in next generation sequencing (NGS), per garantire un'analisi completa anche su materiale biptico limitato [41]. Infine, allo scopo di verificare la possibilità di adottare regimi immunoterapici, tutti i campioni biptici e/o citologici diagnostici di NSCLC in stadio avanzato privi di alterazioni molecolari in un pannello genico ampio, devono essere analizzati per l'espressione della proteina PD-L1

[42, 43]. In considerazione dei significativi risultati ottenuti dalla recente adozione, anche in prima linea, di farmaci inibitori degli immunocheck-points, una ulteriore richiesta che dovrebbe essere soddisfatta da parte del patologo, è rappresentata dalla ricerca dei livelli di espressione di PD-L1 determinati dall'elevata percentuale di cellule neoplastiche (>50%) di adenocarcinoma e/o di carcinoma squamoso che risultino immunoreattive agli anticorpi anti-PD-L1 [44, 45]. A tale riguardo, sempre più evidenze stanno emergendo sul ridotto beneficio dell'immunoterapia nei pazienti con PD-L1 iperespresso in presenza di un driver molecolare alterato, per cui un ampio pannello genico è sempre raccomandato [46]. Inoltre, sempre più si sta affermando il ruolo della biopsia liquida per la ricerca di mutazioni, laddove per EGFR è considerata uno standard sufficiente alla prescrivibilità degli inibitori tirosinchinasici [47].

In tale scenario, il patologo dovrebbe cogliere l'occasione per essere coprotagonista, all'interno di un gruppo multidisciplinare integrato, nella gestione del materiale biologico da trasformare efficacemente nel necessario numero di informazioni morfologiche, fenotipiche e molecolari, indispensabili a soddisfare le richieste che provengono dagli oncologi a beneficio di un trattamento personalizzato dei pazienti affetti da carcinoma polmonare [48].

RACCOMANDAZIONI

Nei pazienti affetti da NSCLC metastatico, laddove non sia raggiunta su base morfologica, la sottotipizzazione in adenocarcinoma e carcinoma squamocellulare deve essere sempre perseguita, anche avvalendosi di un pannello immunoistochimico minimo, in maniera di ridurre al di sotto del 10% le diagnosi generiche di NSCLC e di preservare il campione biologico per le analisi biomolecolari.

LIVELLO DI EVIDENZA IA

GRADO DI RACCOMANDAZIONE A

Nei pazienti affetti da NSCLC metastatico, la determinazione dello stato mutazionale di EGFR e BRAF V600E e del riarrangiamento di ALK e ROS1 deve essere effettuata in tutti i casi di diagnosi di adenocarcinoma o di NSCLC ed in caso di carcinoma squamoso in pazienti non fumatori.

LIVELLO DI EVIDENZA IA

GRADO DI RACCOMANDAZIONE A

La determinazione dell'espressione di PD-L1, indipendentemente dalla sottotipizzazione di istotipo, deve essere effettuata in tutti i casi di prima diagnosi di NSCLC in stadio avanzato di malattia, ove possibile, contestualmente ad un ampio pannello genico.

LIVELLO DI EVIDENZA IA

GRADO DI RACCOMANDAZIONE A

Nei pazienti affetti da NSCLC metastatico, la determinazione di un ampio pannello genico volto ad identificare alterazioni di MET, BRAF, RET, HER2, NTRK, KRAS, è raccomandato nei casi ad istologia adenocarcinoma ed in caso di carcinoma squamoso in pazienti non fumatori. La valutazione di MET è raccomandata anche nell'istologia squamosa e sarcomatoide.

LIVELLO DI EVIDENZA IIB

GRADO DI RACCOMANDAZIONE B

BIBLIOGRAFIA

1. Cagle PT, Dacic S. Lung cancer and the future of pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Mar;135(3):293-5.
2. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG eds. *Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. WHO Classification of Tumours.* Lyon, France: IARC Press; 2015.
3. Schiller JH, Harrington D, Belani C, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2002;346:92-98.
4. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol.* 2004;22:330-353.
5. 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;26:3543-3551.
6. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355:2542-2550.
7. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): An open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373:1525-1531.
8. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-957.
9. Hirsch FR, Spreafico A, Novello S, et al. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer. A literature review. *J Thorac Oncol.*2008;3:1468-1481.
10. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, et al. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Dec 20;28(36):5311-20.
11. Rossi G, Pelosi G, Graziano P et al. A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non-small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int J Surg Pathol.* 2009 Jun;17(3):206-18.
12. 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 May;137(5):668-84.
13. Rossi G, Tiseo M, Cavazza A, et al. Is immunohistochemistry always required to diagnose lung cancer? *Adv Anat Pathol* 2013;20:327-33.
14. Rossi G, Pelosi G, Graziano P, et al. A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non-small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int J Surg Pathol.* 2009 Jun;17(3):206-18.
15. 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 Nov;6(11):1849-56.
16. Righi L, Graziano P, Fornari A, et al. Immunohistochemical subtyping of non small cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer.* 2011 Aug 1;117(15):3416-23.
17. Wallace WA. The challenge of classifying poorly differentiated tumours in the lung. *Histopathology.* 2009 Jan;54(1):28-42.
18. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 2011 Jan;35(1):15-25.
19. Saqi A. The State of Cell Blocks and Ancillary Testing: Past, Present, and Future. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Dec;140(12):1318-1322.
20. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, 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 Mar;6(3):451-8.
21. Bozzetti C, Naldi N, Nizzoli R, et al. Reliability of EGFR and KRAS mutation analysis on fine-needle aspiration washing in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2013 Apr;80(1):35-8.
22. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
23. 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 May 20;350(21):2129-39.
24. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 7;101(36):13306-11.

25. 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;352:786-92.
26. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
27. Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016 May;17(5):577-89.
28. Thress KS, Pawelczak CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*. 2015;21(6):560-562.
29. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1689-1699.
30. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1046-1061.
31. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561-6
32. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1693-703.
33. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4247-53.
34. Paik JH, Choe G, Kim H, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol*. 2011 Mar;6(3):466-72.
35. Marchetti A, Barberis M, Papotti M, et al. ALK rearrangement testing by FISH analysis in non-small-cell lung cancer patients: results of the first italian external quality assurance scheme. *J Thorac Oncol*. 2014 Oct;9(10):1470-6.
36. 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 May;9(5):631-8.
37. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1963-71.
38. Sholl LM, Sun H, Butaney M, et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Sep;37(9):1441-9.
39. Shan L, Lian F, Guo L, et al. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR.
40. Prk Sj, More S, Murtuza A, et al. New targets in Non-Small Cell Lung Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017; 31(1): 113-129.
41. Sabari JK, Santini F, Bergagnini I, et al. Changing the therapeutic landscape in Non-small cell lung cancers: the evolution of comprehensive molecular profiling improves access to therapy. *Curr Oncol Rep* 2017; 19(4): 24.
42. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018-28.
43. 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 Apr 9;387(10027):1540-50.
44. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1823-1833
45. Marchetti A, Barberis M, Franco R, et al. Multicenter Comparison of 22C3 PharmDx (Agilent) and SP263 (Ventana) Assays to Test PD-L1 Expression for NSCLC Patients to Be Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *J Thorac Oncol*. 2017 Nov;12(11):1654-1663.
46. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, et al. Immune Checkpoint Inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET Registry. *Ann Oncol* 2019; 30(8): 1321-1328.
47. Mayo-de-Las-Casas C, Garzon Ibanez M, Jordana-Ariza N, et al. An update on liquid biopsy analysis for diagnostic and monitoring applications in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; 18(1): 35-45.44. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1823-1833
48. Hirsch FR, Wynes MW, Gandara DR, et al. The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Oct 15;16(20):4909-11.