

**Anna Crescenzi<sup>1</sup>, Antonella Bianchi<sup>1</sup>, Ombretta Annibaldi<sup>2</sup>, Giuseppe Avvisati<sup>2</sup>, Fabio Miraglia<sup>3</sup>, Giovanni Zelano<sup>3</sup>.**

*1 UOC Anatomia Patologica- Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma, Italia; 2 UOC Ematologia - Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma, Italia; 3 Giomi Innovation and Research Srl, Roma, Italia.*

**Introduzione e Scopo:** L'asse PD1/PD-L1 è uno dei principali meccanismi utilizzati per sfuggire alla sorveglianza immunologica da parte di numerosi tumori nei quali si osserva un'up-regulation di PD-L1 (Fig. 1). Il successo delle terapie di blocco dei checkpoint immunitari nel trattamento di diversi tumori solidi ha incoraggiato la ricerca di simili risultati anche nello spettro delle malattie linfoproliferative (Fig. 2 e 3).

Allo scopo di migliorare l'efficacia terapeutica di tale approccio, diversi studi sono stati condotti per investigare e quantificare i livelli di espressione di PD-1/PD-L1 mediante immunistochemica (IIC). Risultati affidabili possono essere ottenuti solo dopo la standardizzazione delle procedure di analisi. Ad oggi numerosi aspetti critici sono in fase di valutazione per determinare la riproducibilità dell'immunistochemica di PD-1/PD-L1. Lo studio si basa su una estesa revisione della letteratura scientifica allo scopo di trovare una standardizzazione nella determinazione immunistochemica dell'espressione di PD-L1 nei tessuti come marcatore predittivo di risposta alla immunoterapia.

**Materiali e metodi:** La revisione della letteratura internazionale sulla determinazione immunistochemica, è stata volta a focalizzare i seguenti punti critici: a) disponibilità di cloni anticorpali diversi con differenti specificità e protocolli; b) interferenza della fase pre-analitica sui risultati finali; c) protocolli di colorazione; d) cut-off di espressione in percentuale di cellule positive; e) cut-off di intensità di colorazione; f) popolazione neoplastica>infiammatoria in cui valutare l'espressione; g) quantità minima di tessuto neoplastico da esaminare; h) attendibilità dei campioni citologici; i) implementazione di metodiche future.

**Risultati:** I lavori di riferimento hanno permesso di ottenere informazioni che possono essere tradotte in **raccomandazioni per la determinazione immunistochemica di PD-L1:**

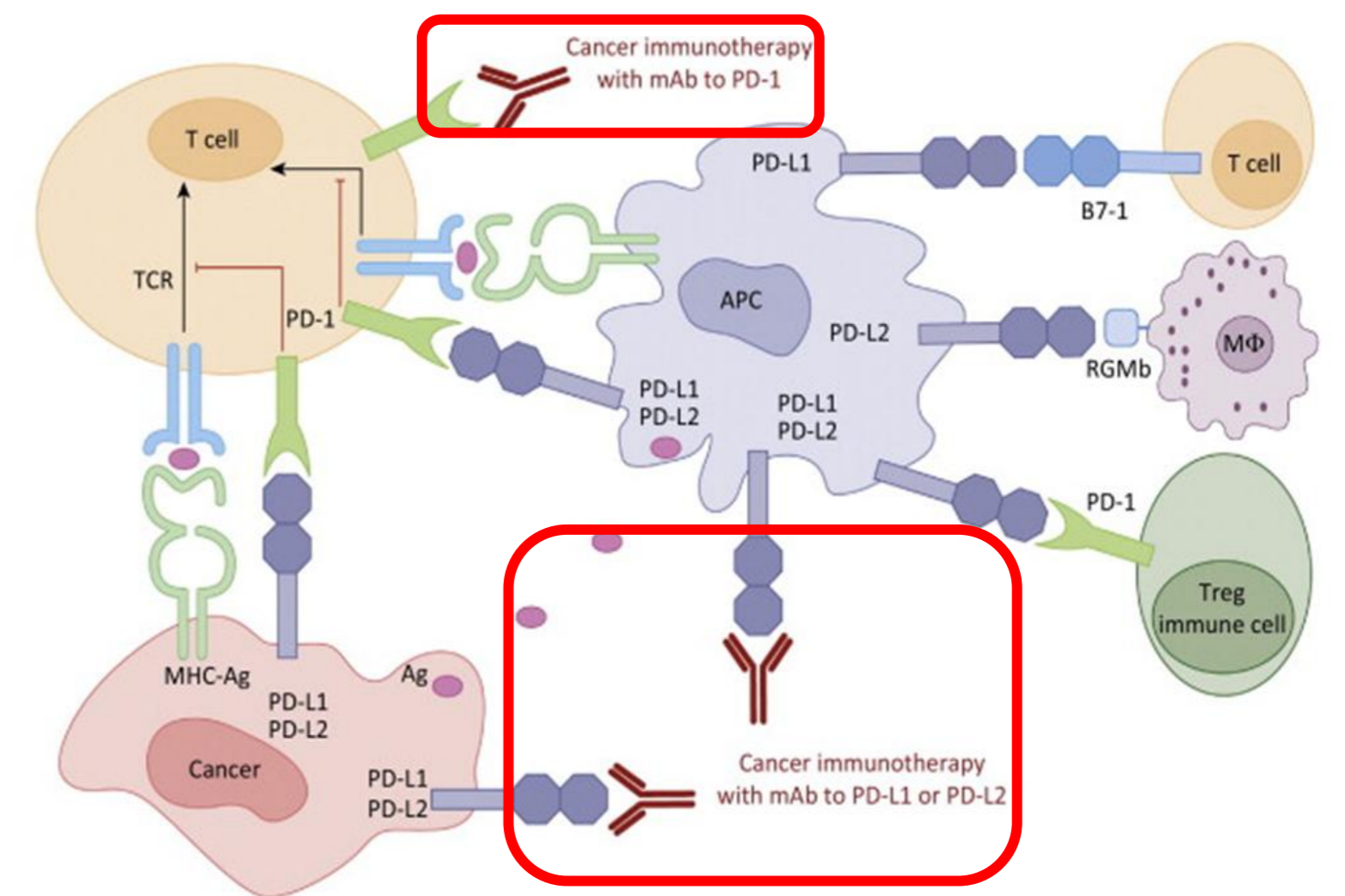
- Differenti cloni sono commercializzati e la scelta dipende dal farmaco, quindi deve esistere una sinergia tra patologo e oncologo.
- I tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono adatti per essere analizzati e consentono la valutazione morfologica del sito di espressione dei biomarker predittivi, ma le condizioni analitiche e pre-analitiche devono essere monitorate al fine di avere risultati affidabili e riproducibili:
  - il tempo di fissazione deve essere di 24- 48 ore in formalina tamponata neutra al 10%;
  - la temperatura della paraffina non deve superare i 60°C;
  - le sezioni in paraffina devono essere di spessore pari a 4-5 micron;
  - sezioni di controllo positive e negative devono essere incluse in ogni sessione di colorazione. La colorazione deve essere ripetuta se il controllo positivo non si colora, se il controllo negativo mostra un qualsiasi grado di colorazione o se un background di colorazione tale da limitare l'interpretazione dello score è presente nelle sezioni del paziente. Per ciascun saggio il patologo deve discriminare cosa costituisce reale colorazione da cosa è artefatto.
- Un patologo esperto deve valutare il pattern di colorazione sia nelle cellule che morfologicamente appaiono in modo inequivocabile tumorali sia nelle cellule infiammatorie infiltranti.
- Il punteggio deve essere ottenuto utilizzando obiettivi 10-20x e se necessario confermato a 40x. L'espressione di PD-L1 deve essere valutata semiquantitativamente in aree rappresentative con la più alta percentuale di cellule neoplastiche, mentre le aree tumorali con necrosi devono essere escluse.
- Anche se un cut-off generale non è stato ancora stabilito è fondamentale che il referto patologico comprenda il clone utilizzato, la popolazione valutata (neoplastica e non), la % di cellule positive e l'intensità della colorazione.
- Campioni citologici possono essere utilizzati ma dovrebbero essere allestiti come citoinclusi.

Come prospettiva futura, l'utilizzo dell' **ibridazione in situ per l'mRNA del PD-L1** sembra essere una Metodica promettente e riproducibile e quindi una valida alternativa all'immunistochemica.

Infatti l' ibridazione in situ per l'mRNA consente:

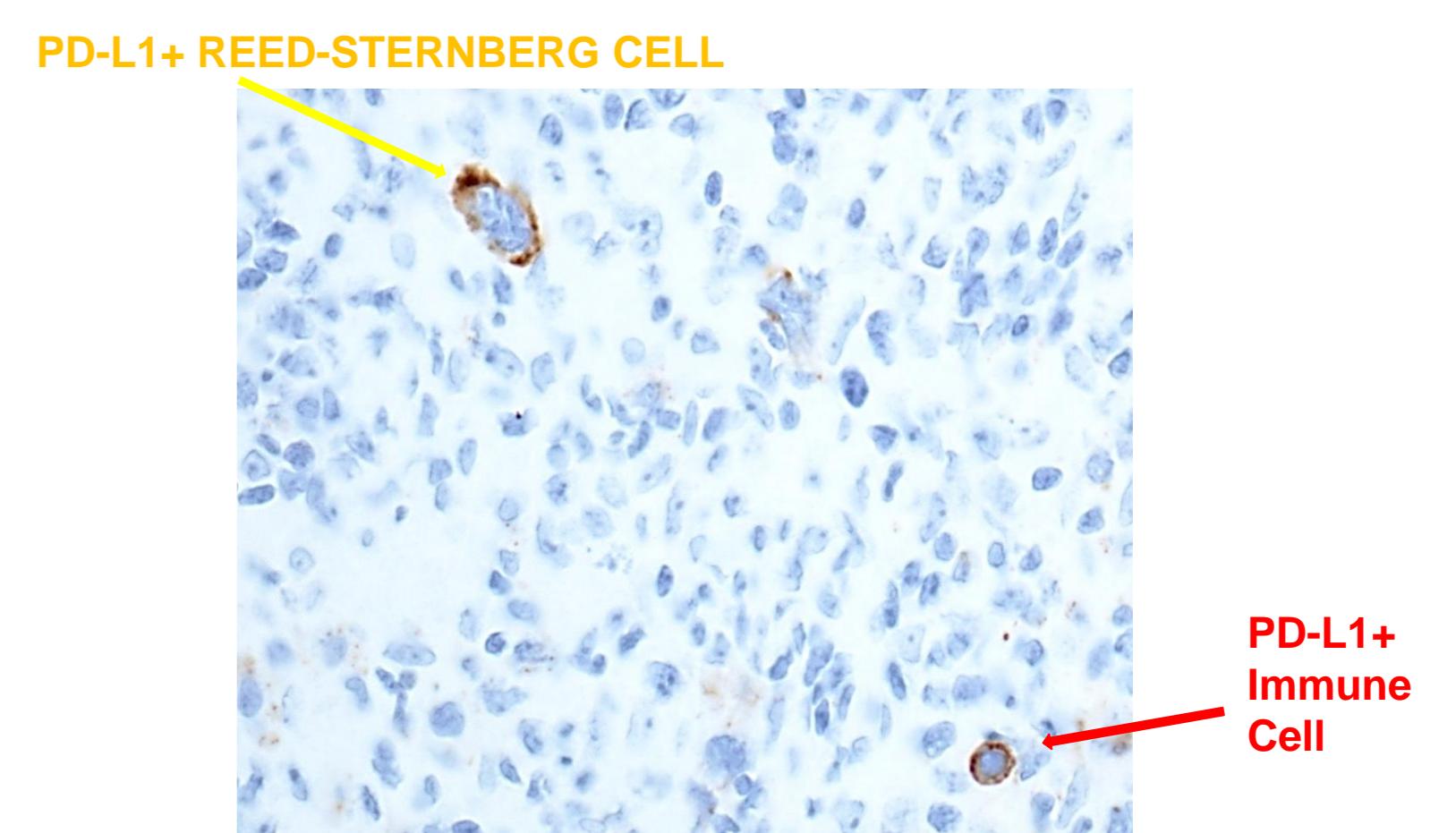
- l'individuazione di uno specifico RNA con una sensibilità di rilevazione pari ad una singola molecola;
- l'individuazione di target difficili come RNA degradati, RNA transitoriamente espressi ed RNA in campioni ossei;
- analisi di ampie tipologie di campioni, inclusi i tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (compresi i TMA) ed i tessuti congelati.

**Conclusioni:** L'immunistochemica di PD-L1 come un saggio predittivo per la selezione dei pazienti per terapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 sta diventando un passaggio cruciale non solo nei tumori solidi ma anche nei linfomi. Per la convalida dei criteri di refertazione è necessaria una maggiore quantità di dati confermati. Nel frattempo i laboratori di patologia e le ematologie dovranno collaborare per lo sviluppo, la consegna e l'interpretazione dei test immunistochemici di PD-L1.

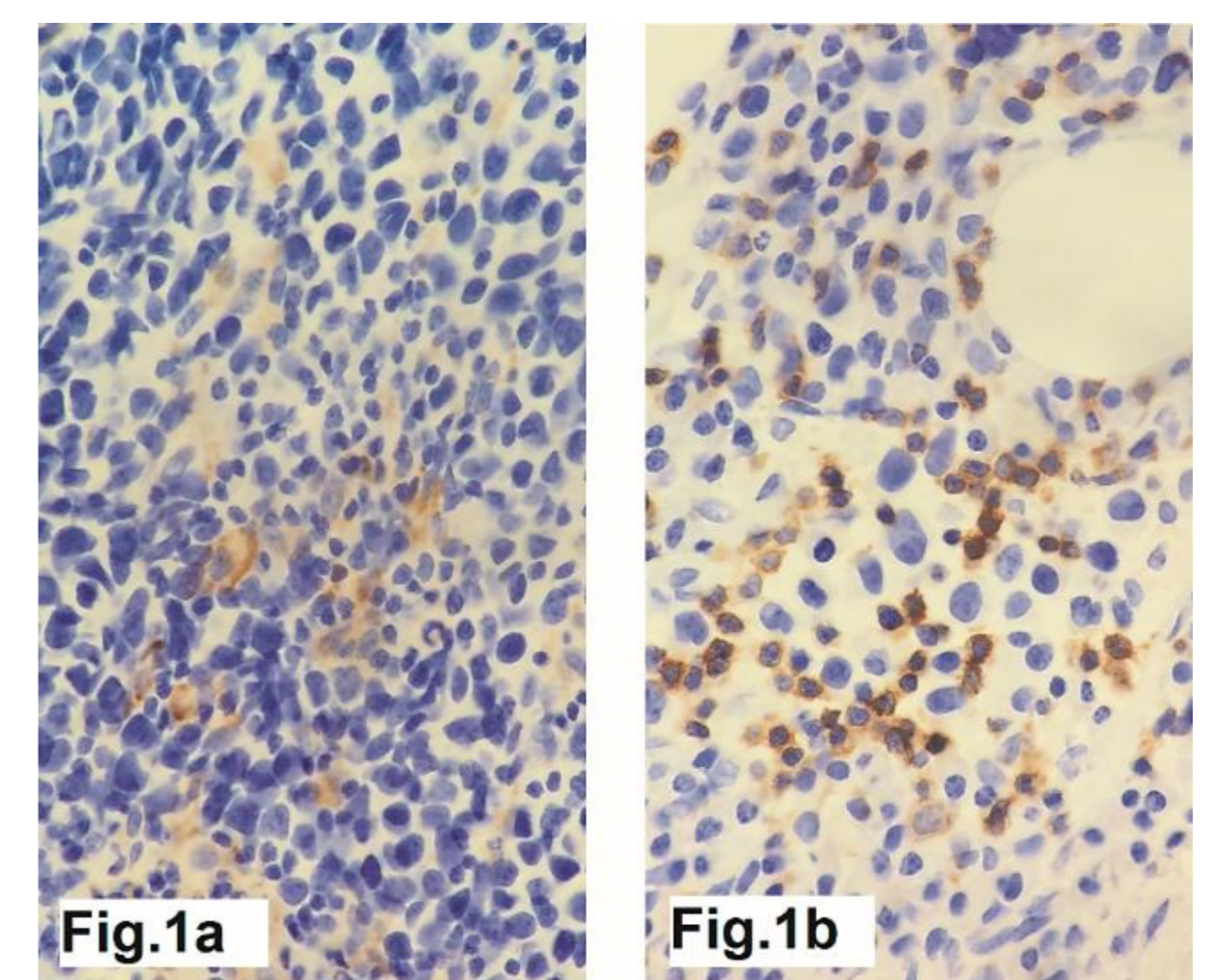


**Fig. 1 Il checkpoint PD-1/PD-L1: una strategia del tumore per sfuggire alla sorveglianza immunitaria**

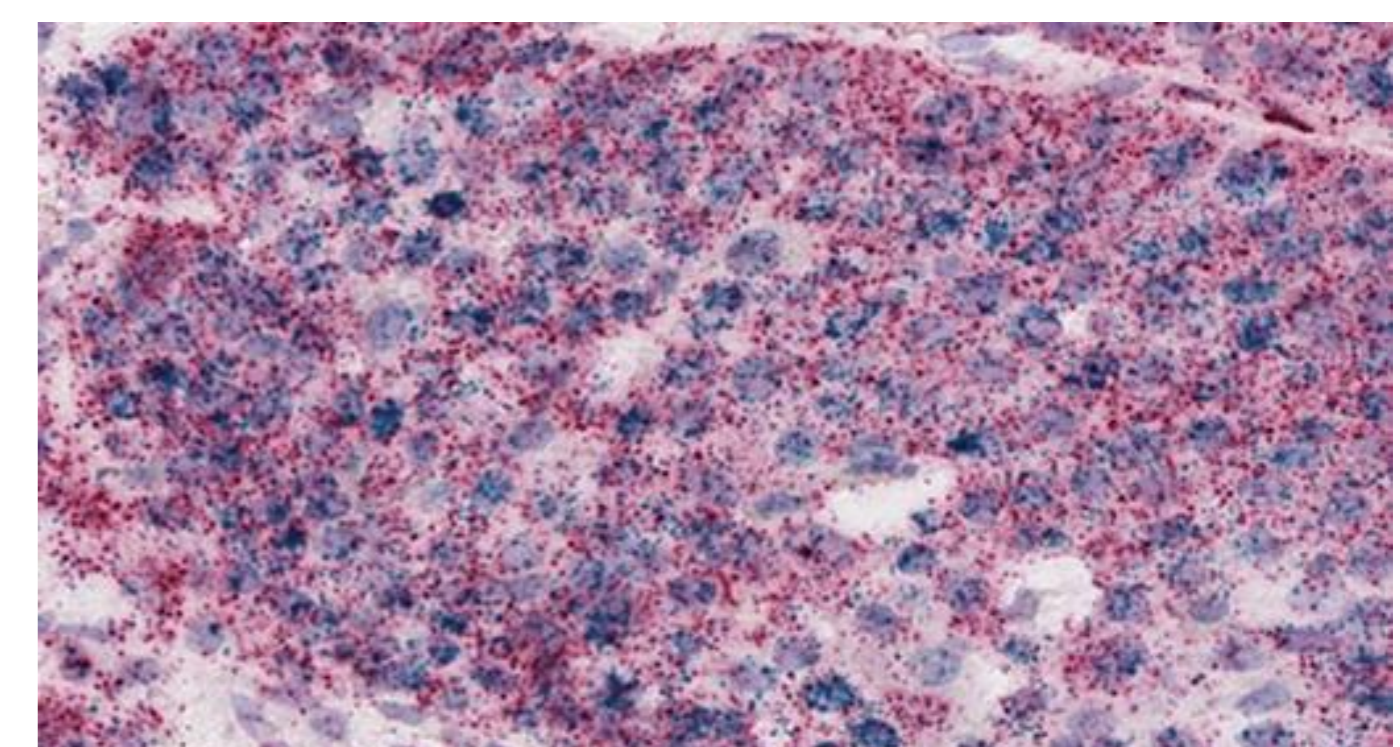
L'immunità antitumorale ha inizio con il priming e l'attivazione delle cellule T a seguito della presentazione dell'antigene tumorale nel contesto delle molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) espresse dalle Cellule Presentanti l'Antigene (APC). Dopo l'attivazione, le cellule T effettrici iniziano a rilasciare diverse citochine (GM-CSF, IL-4, IFN $\gamma$ ) che inducono l'up-regulation di PD-L1. L'interazione del recettore PD-L1, iperespresso nelle cellule tumorali, con il recettore inibitorio PD-1 espresso sulle cellule T attivate dà origine a segnali inibitori che causano apoptosi o esaurimento funzionale delle cellule T stesse. Il blocco dell'interazione PD-1 / PD-L1, utilizzando gli anticorpi diretti contro PD-1 o PD-L1, ripristina la capacità delle cellule T di esercitare funzioni citolitiche dirette contro le cellule neoplastiche.



**Fig. 2 PD-1/PD-L1 nel linfoma di Hodgkin**



**Fig. 3 PD-1/PD-L1 nel mieloma multiplo (Crescenzi et. Al., Leukemia Research, 2016)**



**Fig. 4 Ibridazione in situ per l'mRNA**