



**Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Carrera de Medicina**

**Año 2023
Trabajo Final de Carrera (Tesis)**

**Estimar la prevalencia de PD-L1 y PD 1 en
pacientes con carcinoma urotelial no
musculo invasor**

**Estimation of the prevalence of
overexpressed PD-L1 and PD 1 in patients
with nonmuscle invasive urothelial
carcinoma**

Alumno:

Guido Mandiello

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3271-0141>

guido.mandiello@alumnos.uai.edu.ar

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad Abierta Interamericana

Tutor:

Sergio Morales Bayo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7007-0694>

sergiobayo@yahoo.com.ar

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad Abierta Interamericana

Agradecimientos:

Le debo un gran agradecimiento a mi tutor, el Doctor Sergio Morales Bayo sin el cual no habría podido realizar este trabajo. Me brindo su tiempo, conocimiento, despertando en mí un resurgimiento en mi amor por esta profesión. Gracias por enseñarme y ser un guía en tiempos de incertidumbre.

Estimar la prevalencia de PD-L1 y PD1 en pacientes con carcinoma urotelial no musculo invasor

Estimation of the prevalence of overexpressed PD-L1 and PD 1 in patients with nonmuscle invasive urothelial carcinoma

Autores: Mandiello G, Morales Bayo S.

Resumen

Introducción: En nuestro país, el cáncer de vejiga es la segunda enfermedad urológica tumoral en cuanto a incidencia y prevalencia, la tercera causa de mortalidad por tumores urológicos pero la de mayor morbilidad dada su elevada tasa de recurrencia y sintomatología asociada a cada evento, sin poder ponderarse adecuadamente el deterioro psicofísico que este tumor genera, dada su capacidad de recaída, malignización y diseminación. El advenimiento de nuevos marcadores moleculares, entre ellos PD-L1, permiten diagnosticar con mayor precisión la estirpe tumoral, así como la capacidad de evasión del sistema inmune que permiten reconocerlo como blanco molecular de nuevas drogas biológicas, lo que otorga a este ligando una importancia cada vez mayor sobre su potencial uso terapéutico. Mediante el presente trabajo de investigación se pretende conocer la tasa de pacientes atendidos en el Servicio de Urología del Hospital Prof. Dr. Bernardo Houssay de Vicente López diagnosticados con carcinoma urotelial que sobreexpresen PD-L1 y que podrían beneficiarse con tratamientos biológicos disponibles dirigidos contra ese ligando. **Material y métodos:** Análisis de tacos en parafina con carcinoma urotelial invasor y no músculo invasor mediante inmunohistoquímica, para estimar la tasa de expresión de PD-L1 y PD 1. **Resultados:** Edad media, 70 años; Relación hombre / mujer 3:1. La expresión de PD-L1 se observó en el 12% de los tumores pTa, el 26% de pT1, el 22% de pT2a y el 32 %pT2b. **Conclusión:** En la población estudiada, la tasa de la expresión del ligando es sensiblemente superior a estudios previos, especialmente en tumores de bajo grado. Dado que no se alcanzó el "n" requerido se deberá extender el estudio hasta completarlo.

Palabras Clave: Carcinoma, Transitional Cell; Immune Checkpoint Inhibitors; Immunotherapy; Urinary Bladder Neoplasms; Prevalence; Programmed death-ligand 1.

Abstract

Background: In our country, bladder cancer is the second urological tumor disease in terms of incidence and prevalence, the third cause of mortality from urological tumors but the one with the highest morbidity given its high rate of recurrence and symptoms associated with each event, without to be able to adequately weigh the psychophysical deterioration that this tumor generates, given its capacity for relapse, malignancy, and dissemination. The advent of new molecular markers, including PD-L1, allow a more precise diagnosis of the tumor lineage, as well as the evasion capacity of the immune system that allows it to be recognized as a molecular target of new biological drugs, which gives this ligand importance. about its potential therapeutic use. Through this research work, we intend to know the rate of patients treated in the Urology Service of the Hospital Prof. Dr. Bernardo Houssay de Vicente López diagnosed with urothelial carcinoma that overexpress PD-L1 and who could benefit from available biological treatments directed against this ligand. **Material and methods:** Analysis of paraffin wads with invasive and non-muscle invasive urothelial carcinoma by immunohistochemistry, to estimate the expression rate of PD-L1 and PD 1. **Results:** Average age, 70 years; Male / female ratio 3:1. PD-L1 expression was observed in 12% of pTa, 26% pT1, 22% pT2a and 32% pT2b tumors. **Conclusion:** In the studied population, the ligand expression rate is significantly higher than previous studies, especially in low-grade tumors. Since the required “n” was not reached, the study should be extended until it is completed.

Keywords: Carcinoma, Transitional Cell; Immune Checkpoint Inhibitors; Immunotherapy; Urinary Bladder Neoplasms; Prevalence; Programmed death-ligand 1.

INTRODUCCIÓN

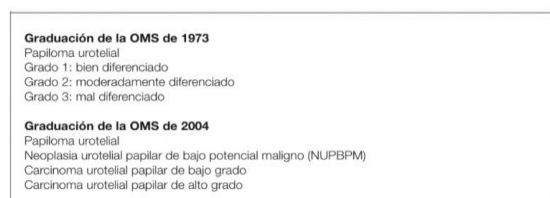
El cáncer de vejiga es el décimo cáncer más diagnosticado en el mundo, con aproximadamente 573.000 nuevos casos y 213.000 muertes (1). Es más frecuente en los hombres que en las mujeres, con unas tasas de incidencia y mortalidad respectivas de 9,5 y 3,3 por 100.000 entre los hombres, que son aproximadamente 4 veces las de las mujeres a nivel mundial (1). Se ubica entre el 4 y 10 lugar de incidencia a nivel Mundial, dependiendo de las regiones; ubicándose como décimo cáncer en incidencia en el territorio argentino (2). Más del 90% de los cánceres de vejiga son de histología urotelial; el carcinoma urotelial de vejiga se clasifica histopatológicamente en alto y bajo grado de malignidad y en no musculo invasor y musculo invasor (4). Alrededor del 75 % de los tumores de vejiga, al momento del diagnóstico son del tipo “no musculo invasor”, aunque la tasa de expresión de PD-L1 en estos tumores es muy variable según los diferentes reportes (3).

El grado de expresión de PD-L1 está relacionado con el efecto terapéutico de los inhibidores de PD-1/PD-L1, y en general, los pacientes que muestran una mayor expresión de estos ligandos suelen experimentar una respuesta significativamente mejor al tratamiento que los pacientes que muestran una menor expresión o expresión negativa; no obstante, se ha informado que algunos pacientes con biomarcadores negativos logran de todas formas respuestas terapéuticas parciales y en algunos pocos casos, respuestas completas (6)(7)(8).

La sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales, detectada mediante inmunohistoquímica, se asocia con tasas de respuesta significativamente más altas a los inhibidores del eje PD-1/PD-L1 en una variedad de tumores sólidos malignos (9). La expresión de PD-L1 es mayor en células tumorales que invaden la capa muscular de la vejiga (6). También se ha postulado que la expresión de PD-L1 podría utilizarse en pacientes con cáncer urotelial como biomarcador de respuesta terapéutica favorable (7).

La presente investigación pretendió conocer con mayor precisión la población con cáncer de vejiga no musculo invasor que expresan PD-L1 y que podrían beneficiarse mediante inmunoterapia con inhibidores de PD-1 y PD-L1. Hay múltiples estudios y revisiones sistemáticas en las que se evidencia una alta sobreexpresión de PD-L1 en cánceres músculo invasores y metastásicos y se menciona que suele haber una baja expresión en los cánceres uroteliales no músculos invasores sin una casuística exhaustiva, ya que no muchos estudios se han abocado al análisis de esta subclase tumoral (6)(7)(8)(9).

La población de pacientes que fue investigada tiene un fuerte sesgo poblacional. Los pacientes del Hospital Prof. Dr. Bernardo Houssay de Vicente López son en su gran



En el siguiente esquema se aprecia como se sobreponen la clasificación de 1973 y la del 2004:

Figure 1: Stratification of tumours according to grade in the WHO 1973 and 2004 classifications (22)*

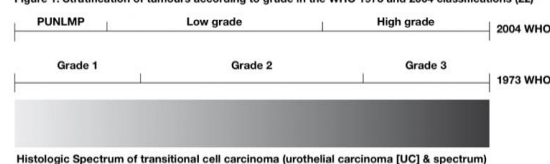


Tabla 1: Clasificación cáncer urotelial (5).

mayoría (76%) mayores 60/65 años (JUBILADOS -PAMI), y entre un 82 y 86 % descendientes de europeos (principalmente España e Italia, donde se registra una alta incidencia de cáncer urotelial). En el Servicio de Urología del Hospital Houssay, entre un 70 a 80% de cánceres de vejiga son de bajo grado no músculo invasores, son una tasa de recidiva mayor al 45% (10). Este sesgo poblacional es lo que permite inferir que la expresión de PD-L1 en pacientes con cáncer no músculo invasor, puede ser mayor que el presentado en la literatura, justificando de este modo el screening de PD-L1 en la población estudiada. En el servicio de urología del Hospital Dr. Bernardo Houssay de Vicente López se diagnostican y operan alrededor de 60-70 pacientes con cáncer de vejiga por año (66 pacientes en 2021). La detección de un porcentaje de pacientes con PD-L1 sobre-expresado mayor o igual a la hallada en la literatura, permite inferir que un alto número de estos pacientes podrían beneficiarse con la implementación de tratamiento inmunoterápicos dirigidos a ese blanco molecular; pudiendo disminuir la alta tasa de recidivas documentadas en esta patología, las intervenciones quirúrgicas, la morbilidad, y los costos sanitarios generados por las mismas. En la literatura internacional se observó una expresión de PD-L1 en el 7% de los tumores pTa, el 16% de pT1, el 23% de pT2, el 30% de pT3 / 4 y el 45% de los tumores de carcinoma in situ (CIS)(11)(12)(13) (14). La expresión de PD-L1 se asoció con tumores de alto grado (razón de posibilidades [OR] = 2,4, $p = 0,009$). los valores OR mayores de 1 indican asociación positiva entre las variables. Los tumores de alto grado tienen 2.07 veces más probabilidad de expresar PD-L1, por lo tanto, serán en general más agresivos y de peor pronóstico. La hipótesis planteo que en nuestra población la expresión de PD-L1 podría ser mayor en los estadios bajos que la observada en otras poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este Ensayo fue de carácter Observacional Transversal Retrospectivo y Descriptivo. Se revisaron tacos en parafina de los pacientes atendidos en el Servicio de Urología del Hospital Dr. B. Houssay, que corresponden al período 2021-2022. Se seleccionaron aquellos pacientes con diagnóstico de carcinoma urotelial de alto y bajo grado de malignidad no músculo invasor e invasor. Algunos pacientes presentaron en forma concomitante carcinoma invasor; los cuales fueron analizados para su inclusión en el estudio. Se realizó la detección del ligando PD-L1 mediante Inmunohistoquímica automática. La mitad de las muestras se analizaron con el Sistema Benchmark ULTRA. Kit Monoclonal Mouse 22C3 - pharmDx (SK 006) Peroxidase reagent. El análisis IHQ automático se realizó en Argenomics SA, Laboratorio de genómica y biología molecular (Tec. Lic. José Reverol). La otra mitad de las muestras se analizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Htal. Houssay con equipo automático

Ventana Bench Mark Ultra con controles negativos para cada taco y controles positivos para cada suero (PD-L1 - SP142 - SP263 Ventana). El cálculo de prevalencia se estimó utilizando porcentajes (intervalo de confianza del 95%). Para los datos discretos se usaron frecuencias (porcentajes). Los datos continuos se resumen descriptivamente utilizando la media (desviación estándar) o la mediana (rango). El grado de significancia estadística es $p < 0.05$. (Para estos análisis se utilizará el programa Microsoft Office Excel 2007). La muestra poblacional "n" requerida para el presente estudio se obtuvo mediante calculadora estadística online, gratis "NesQuet", el cual nos indicó que debieran ser 371 pacientes necesarios para un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

De los 371 pacientes requeridos para este estudio, hasta el momento de la publicación de este trabajo; se lograron analizar 167 casos, divididos en 2 etapas. En una etapa inicial, se analizaron 123 casos, de los cuales 86 casos tuvieron expresión de PD-L1. De esos 86 casos, 63 masculinos (73%) y 23 femeninos (27%). Dando una relación 3:1 Hombre/Mujer y edad media 69 años (rango 52-86). El 11% correspondieron a tumores pTa, el 21% de pT1, el 25% de pT2a y el 31% en pT2b, otros 12%. No se analizaron los tumores de carcinoma in situ (CIS). La expresión de PD-L1 se asoció con tumores de alto grado (razón de posibilidades [OR] = 2,4, $p = 0,009$).

En una segunda etapa, se lograron analizar 40 casos, de los cuales 22 casos tuvieron expresión de PD-L1. Correspondiendo a tumores pTa en un 13 %, el 45% de pT1, el 18% de pT2a y el 23% en pT2b*.

Luego de analizar el conjunto de casos, la expresión de PD-L1 se asoció con tumores de alto grado (razón de posibilidades [OR] = 2,07, $p = 0,0005$).

Results

Odds ratio	2.0741
95 % CI:	1.3768 to 3.1245
z statistic	3.489
Significance level	P = 0.0005

Computational notes

The odds ratio (OR), its standard error and 95% confidence interval are calculated according to Altman, 1991.

De esos 126 casos de carcinomas uroteliales diagnosticados, 91 (71%) correspondieron al sexo masculino y 37 (29%) al femenino. La edad media de presentación fue 70 años (rango 34-96 años), Relación hombre / Mujer 3:1; La edad de aparición en la mujer fue de 4 años menos, diferencia con significación estadística.

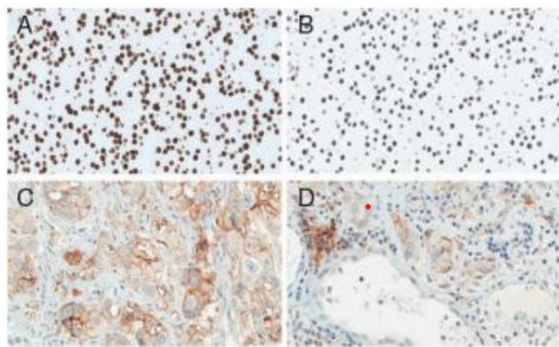


Imagen 1: Expresión de PD-L1 en muestras de cáncer vesical teñidas con anticuerpo anti-PD-L1 (22C3). Los controles positivos y negativos para la expresión de PD-L1 se presentan en (A) y (B), respectivamente. La tinción membranosa positiva está presente en las células tumorales en (C). En (D), las células tumorales son negativas y las células mononucleares que infiltran el tumor son positivas para PD-L1.

DISCUSIÓN

La edad media de presentación del cáncer urotelial en la muestra estudiada fue de 70 años. Relación hombre / Mujer 3-4:1; La edad de aparición en la mujer fue de 4 años menos, diferencia con significación estadística.

Ambos métodos de detección mediante IHQ utilizado, así como los kits comerciales a base de anticuerpo monoclonal anti PD-L1 y peroxidasa fue simple, confiable y reproducible.

Las características generales de presentación en esta muestra coinciden en general con resultados de estudios previos. Pero según nuestra hipótesis de trabajo, al presentar una población más sesgada en relación con los datos demográficos estudiados, se hallaron porcentajes de expresión del ligando PD-L1 donde el OR es ligeramente inferior al publicado, pero igualmente significativamente estadístico. Especialmente con una mayor expresión de PD-L1 en tumores pT1, aunque aún no se alcanzó a reclutar el "n" requerido en el estudio. Para obtener resultados más concluyentes se requerirán analizar mayor número de pacientes. Según el análisis de los datos recabados en esta investigación hasta el momento, la sobreexpresión de PD-L1 justificaría el screening del ligando en el análisis de todas las muestras patológicas a fin de conocer la probable tasa de respuesta a la coadyuvancia con BCG, así como la posibilidad de utilizar tratamientos con anticuerpos monoclonales anti PD-L1 con el objeto de reducir el porcentaje de recidivas en carcinomas uroteliales no musculo invasores.

Sin embargo, se necesita analizar a un mayor número de paciente para obtener el nivel de confianza necesario.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 [citado 4 de octubre de 2022];71(3):209-49. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21660>
2. Elaborado por SIVER/INC en base a los datos de Globocan2020. Argentina 2021
3. American Society of Clinical Oncology (ASCO 2019) <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-devejiga/introducci%C3%B3n>
4. Woldu SL, Bagrodia A, Lotan Y. Guideline of Guidelines – Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *BJU Int* [Internet]. marzo de 2017 [citado 28 de septiembre de 2022];119(3):371-80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5315602/>
5. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. diciembre de 1998;22(12):1435-48.
6. Sonpavde GP, Grivas P, Lin Y, Hennessy D, Hunt JD. Immune-related adverse events with PD-1 versus PD-L1 inhibitors: a meta-analysis of 8730 patients from clinical trials. *Future Oncol* [Internet]. julio de 2021 [citado 16 de octubre de 2022];17(19):2545-58. Disponible:<https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fon-2020-1222>
7. Ding X, Chen Q, Yang Z, Li J, Zhan H, Lu N, et al. Clinicopathological and prognostic value of PD-L1 in urothelial carcinoma: a meta-analysis. *Cancer Manag Res* [Internet]. 8 de mayo de 2019 [citado 15 de octubre de 2022];11:4171-84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6512637/>
8. Huang J, Teng X. Expression of PD-L1 for predicting response to immune checkpoint inhibitors in metastatic urothelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Curr Oncol Tor Ont*. diciembre de 2020;27(6):e656-63.
9. Wang X, Bao Z, Zhang X, Li F, Lai T, Cao C, et al. Effectiveness and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors in the

treatment of solid tumors: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget [Internet]. 31 de mayo de 2017 [citado 15 de octubre de 2022];8(35):59901-14. Disponible:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601788/>

10. Estadística de prevalencia e incidencia de enfermedades tumorales, Servicio de Urología, Htal. Dr. Prof. B. Houssay, Jefatura de Servicio. Última revisión, Oct. 2022)

11. Khunger M, Hernandez AV, Pasupuleti V, Rakshit S, Pennell NA, Stevenson J, et al. Programmed Cell Death 1 (PD-1) Ligand (PD-L1) Expression in Solid Tumors As a Predictive Biomarker of Benefit From PD-1/PD-L1 Axis Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Precis Oncol [Internet].* noviembre de 2017 [citado 16 de octubre de 2022];(1):1-15. <https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/PO.16.00030>

12. Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, Aine M, Häglund M, Kim WY, et al. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol [Internet].* septiembre de 2017 [citado 22 de octubre de 2022];72(3):354-65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5764190/>

13. Schwamborn K, Ammann JU, Knüchel R, Hartmann A, Baretton G, Lasitschka F, et al. Multicentric analytical comparability study of programmed death-ligand 1 expression on tumor-infiltrating immune cells and tumor cells in urothelial bladder cancer using four clinically developed immunohistochemistry assays. *Virchows Arch [Internet].* 2019 [citado 22 de octubre de 2022];475(5):599-608. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6861354/>

14. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev.* marzo de 2017;54:58-67.

