

Boas práticas e recomendações técnicas para avaliação da expressão do recetor proteico PD-L1 em cancro de pulmão

Paulo Teixeira¹, Ana Caramelo², Ana Silvestre³, Ana Santos⁴, Ana Lopes⁵, Ana Alves⁴, Anabela Figueiredo¹, Anabela Penela⁶, Aurora Sousa⁷, Célia Sá⁸, Cláudia Maia⁹, Cláudia Pen¹⁰, Eliana Gonçalves¹¹, Fátima Silva¹, Frederico Pereira⁷, Isa Carneiro¹², Isabel Vitó¹³, José Frutuoso¹⁴, Luís Cirnes², Luís Quintal⁹, Luís Furtado¹⁵, Manuela Novo¹⁶, Maria Malheiro¹¹, Mariana Geraldês¹⁷, Mário Lagaille¹⁶, Marta Barbosa¹⁸, Marta Raposo⁵, Mónica Curado², Patrícia Sampaio⁸, Paulo Infante¹⁹, Sandra Sá²⁰, Sandra Relvas²¹, Sofia Paulino¹², Sónia Morgado²², Tânia Cruz²³, Teresa Pereira²², Vânia Paulo²⁴.

Introdução

O recetor proteico de morte celular programada (PD-1) e os seus ligandos (PD-L1 e PD-L2) pertencem ao grupo de proteínas de checkpoint imunológico, desempenhando um papel relevante no cancro e constituindo uma via de fatores co-inibitórios cuja interação limita a destruição das células tumorais pelas células imunitárias ⁽¹⁾. O recetor PD-L1 expressa-se nas células tumorais e nas células imunes infiltrativas do tumor, interagindo com o ligando PD1 das células T ativadas, induzindo anergia na resposta imune e permitindo que o tumor escape ao reconhecimento imunológico ⁽²⁾.

O bloqueio da via PD-1/PD-L1 reativa a função antitumoral do sistema imune e é atualmente opção de tratamento para vários cancros, como o cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC) localmente avançado ou metastático ⁽³⁻⁶⁾. Várias imunoterapias têm sido aprovadas em CPNPC, usando anticorpos monoclonais inibidores de checkpoints imunológicos anti-PD-L1 (durvalumab e atezolizumab) e anti-PD-1 (pembrolizumab e nivolumab), que bloqueiam via PD-L1/PD-1, restaurando a resposta imune das células T às células tumorais ⁽⁶⁾.

Atualmente, a expressão do recetor PD-L1 constitui um biomarcador preditivo da resposta à terapia com inibidores de *checkpoint* imunológico da via PD-L1/PD1 em diversos tipos de tumores sólidos ⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Para algumas indicações terapêuticas em CPNPC, a determinação da expressão do PD-L1 por imunohistoquímica (IHQ) em amostras de tecido fixado em formol e impregnado em parafina é necessária para aferir a elegibilidade dos doentes para algumas indicações terapêuticas. Atualmente, vários ensaios de IHQ usando clones de anticorpos para avaliar a expressão de PD-L1 em CPNPC têm a aprovação CE-IVD ⁽¹¹⁾, como os ensaios que usam o clone SP263 (Ventana Medical Systems Roche, Oro Valley, EUA) e o clone 22C3 (Agilent Dako Omnis, Santa Clara, EUA) ^(12,13).

A expressão do PD-L1 pode ser avaliada através de diferentes métodos como o *score* da positividade tumoral (TPS), o *score* das células imunes (ICS) e o *score* da positividade

combinada (CPS). O TPS é estimado com base na percentagem de células tumorais com marcação membranar parcial ou completa para a proteína PD-L1 sobre o número total de células tumorais. O ICS é baseado na relação da área de PD-L1 positivo nas células imunes tumorais sobre a totalidade das células tumorais imunes. O CPS corresponde à percentagem de células PD-L1 positivas (incluindo células tumorais e células imunes) sobre o total de células tumorais viáveis e imunes ^(12,14).

A maioria dos laboratórios portugueses utiliza um ensaio único por IHQ para a avaliação da expressão PD-L1 em CPNPC recorrendo ao TPS. Este ensaio é um teste desenvolvido em laboratório (LDT), utilizando o clone 22C3 em plataforma Ventana Benchmark Ultra. A ausência da utilização de um ensaio com a marca CE-IVD, bem como, a necessidade de validação do ensaio LDT em cada laboratório cria potencialmente limitações e/ou variações que podem afetar a performance e reprodutibilidade do ensaio.

Objetivo

Este documento é uma iniciativa da Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica e pretende sintetizar as boas práticas laboratoriais e fazer recomendações técnicas para a determinação da expressão do recetor PD-L1 em amostras de cancro de pulmão.

A necessidade deste documento surge na sequência de um evento nacional que reuniu um painel de 37 Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica de Anatomia Patológica para a discussão de boas práticas nos ensaios de IHQ para a avaliação da expressão PD-L1 em cancro do pulmão.

Esta reunião decorreu a 25 de junho de 2022 e teve o apoio organizativo da AstraZeneca Portugal.

Nesta reunião foi possível identificar os principais aspetos e limitações nas fases pré-analítica e analítica, que afetam atualmente a performance dos ensaios de IHQ do PD-L1 em cancro do pulmão, em contexto da realidade portuguesa.

Para cada tópico apresentado neste documento, é demonstrada a evidência científica atual e as boas práticas laboratoriais estabelecidas e, quando oportuno, são providenciadas recomendações técnicas baseadas na experiência profissional e/ou académica dos especialistas do painel, de forma a definir as condições ótimas para um teste reprodutível e com qualidade

Fase pré-analítica

1: Porque é que é importante conhecer e controlar todas as variáveis que podem afetar a fase pré-analítica do teste PD-L1?

Enquadramento:

A performance de um ensaio de IHQ depende de diferentes variáveis que estão presentes desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica. De acordo com Taylor, a uniformização do teste de IHQ deve ter em conta a sua abordagem total, desde a fase pré-analítica até à redação do relatório anatomopatológico ⁽¹⁵⁾.

Discussão:

As condições pré-analíticas podem influenciar a determinação da expressão do PD-L1 por IHQ e os seus efeitos podem repercutir-se imediatamente após a recolha da amostra biológica para estudo anatomopatológico ⁽¹⁶⁾. As alterações daí decorrentes podem alterar ou até mesmo comprometer a sua interpretação, afetando assim a qualidade e a segurança dos cuidados a prestar ao doente ⁽¹⁷⁾.

A otimização do protocolo de IHQ e a uniformização dos seus resultados dependem principalmente do tempo de isquemia a frio, da solução fixadora usada, da relação entre o volume de fixador e da amostra biológica, do tempo e da temperatura do processo de fixação, **Tabela 1** ^(18,19).

Tabela 1 – Condições pré-analíticas ótimas para a preservação da amostra na determinação do PD-L1; adaptado de ⁽²⁰⁾.

Parâmetros	Condições
Tipo de amostras	Peças cirúrgicas, biópsias histológicas e citoblocos
Tempo de isquemia a frio	Inferior a 30 minutos
Corte histológico	3-5 µm em lâminas adesivadas
Fixador	Formol neutro tamponado 10%
Proporção Fixador/Tecido	10:1
Tempo de fixação	6-48h biópsias e citoblocos, 24-48h peças cirúrgicas (aceitável até 72h)
Tempo de armazenamento dos cortes histológicos	Inferior a 2 meses (aceitável até 12 meses de 2-8°C)
Tempo de armazenamento dos blocos de parafina	Inferior a 3 anos (aceitável até 5 anos)
Condições de temperatura de armazenamento de blocos e lâminas	2-8°C (aceitável temperatura ambiente); ao abrigo da luz, humidade e calor

Fixação de material histológico

Alguns estudos concluem que o **tempo de isquemia a frio** prolongado afeta diversos antígenos, entre eles o PD-L1 ^(21,22). Na era da medicina personalizada e pela necessidade de preservar nas melhores condições as amostras para estudos moleculares, recomenda-se que o

tempo de isquemia a frio seja inferior a 30 minutos ou, idealmente, no menor intervalo de tempo possível ^(16,20) .

O processo de fixação tem impacto na estabilização estrutural e bioquímica do tecido e assenta em diversas variáveis: a espessura do fragmento, o tipo e o pH do fixador, o volume e o tempo de fixação ⁽²³⁾.

Sugere-se a disseção dos fragmentos de tecido e a abertura das peças de ressecção cirúrgica à ação do formol e a **espessura dos fragmentos** das peças de ressecção cirúrgica colhidos para processamento histológico esteja compreendido entre 4 e 5 mm, estabelecendo-se como fixador recomendado o formol neutro tamponado a 10% (FNT 10%) ⁽²⁴⁾. Diversos estudos demonstram que os fixadores de base alcoólica alteram a performance da IHQ pela diminuição da intensidade de imunocoloração, pelo que o seu uso deve ser avaliado ⁽²⁵⁾.

O **volume de fixador** deve ser adequado ao volume da amostra a fixar, tendo como referência a relação entre o volume do fixador e da amostra, para que seja entre 10:1 e 20:1 ⁽²⁶⁾.

Adicionalmente, demonstrou-se que o tempo de fixação pode afetar a performance do ensaio LDT PD-L1 utilizando o clone 22C3 e plataforma Ventana Benchmark Ultra ⁽²⁷⁾. Nesse sentido, o painel de especialistas sugere um **tempo de fixação**, entre 6h e 48h para os fragmentos de biópsia e 24h a 48h para peças de ressecção cirúrgica à temperatura de 20 a 15 °C, sendo aceitável o seu prolongamento até às 72h ⁽²⁸⁾.

Alguns autores referem a vantagem dos sistemas de **condicionamento com vácuo** e formol a 4 °C para preservar e transportar de amostras até ao laboratório, desacelerando o processo de degradação celular ^(29,30).

Descalcificação

Apesar de não ser recomendado processos de **descalcificação** em amostras calcificadas, por falta de validação, estudos recentes mostraram não haver diferenças significativas nas amostras sujeitas a descalfificação para o teste PD-L1 por IHQ ⁽³¹⁾. Contudo, no caso de ser necessário proceder à descalfificação de tecidos calcificados, deve haver particular cuidado em iniciar a descalfificação apenas nas amostras previamente fixadas, recorrendo preferencialmente a soluções descalfificadoras de base EDTA. Estas soluções mostraram ser uma alternativa válida para estudos de IHQ pela ausência de diferenças significativas na expressão do PD-L1 ^(22, 23).

Processamento histológico e microtomia

O **processamento histológico** deve ter protocolos e reagentes uniformizados de boa qualidade, devendo ser monitorizado o estado de pureza de todos os reagentes. A não observância deste processo pode originar desidratação inadequada e induzir nas amostras de arquivo degradação molecular devido a fenómenos de hidrólise ⁽²³⁾.

Os protocolos de fixação e de processamento histológico devem ser previamente validados pelo laboratório e ter monitorização da temperatura utilizada em cada etapa, não devendo ser ultrapassados os 60 °C ⁽³²⁾.

A espessura dos **cortes histológicos** recomendada pela literatura, varia entre 3 e 5 µm sendo 4 µm a espessura mais consensual entre o painel de especialistas, devendo usar-se lâminas histológicas adesivadas com carga positiva ⁽³³⁾. O processo de **adesão e secagem** é eficaz para temperaturas em estufa termostaticada a 37 °C *overnight* ou a 60 °C até 1 hora ⁽³³⁾.

O guia interpretativo do teste PD-L1 refere a possibilidade de armazenar os cortes histológicos durante 12 meses ao abrigo da luz e a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, sem que haja perda significativa da antigenicidade ⁽¹⁶⁾. Alguns estudos referem que podem ser acondicionados durante 2 meses, devendo evitar-se o seu acondicionamento por períodos de tempo prolongado ⁽¹⁶⁾. Outros estudos reportam ainda a diminuição da imunocoloração em amostras de blocos de parafina armazenadas após 1 ano, sugerindo que possa haver degradação da antigenicidade devido à oxidação pela exposição à humidade ⁽³⁶⁻³⁸⁾.

Estes dados mostram a importância do controlo e da monitorização da humidade relativa ambiental no arquivo de amostras em bloco, assim como a manutenção da temperatura ambiente. Para evitar interferências das variáveis supracitadas, o painel de especialistas recomenda a imunocoloração dos cortes histológicos logo após a sua microtomia e secagem.

Fixação e processamento citológico

O diagnóstico anatomopatológico baseia-se preferencialmente em amostras de tecido. No entanto, uma percentagem significativa dos diagnósticos de cancro do pulmão baseiam-se em amostras com um baixo número de células obtidas através de biópsia aspirativa ⁽³⁴⁾.

Os procedimentos para recolher células como o aspirado transbrônquico por agulha e a biópsia endoscópica com agulha fina guiada por ultrassons são minimamente invasivos e, por vezes, são a única possibilidade de obter uma amostra celular com intenção diagnóstica, para estadiamento ou determinação da presença de um alvo terapêutico ^(35,36).

As amostras citológicas podem ser processadas através de diferentes métodos e, por isso, ser uma fonte de variabilidade pré-analítica ⁽³⁷⁾. Um dos métodos mais comuns é o **processamento por citobloco**, embora possa ser também usado o esfregaço direto, o *imprint*, o *cytospin* e a citologia em meio líquido ^(38,39).

Embora o citobloco seja processado de maneira idêntica ao do tecido, a metodologia usada para o obter e o fixador usado é variável ^(38,39). Contudo, alguns estudos verificaram não haver impacto na imunocoloração do PD-L1 em amostras fixadas com metanol/etanol *versus* formol neutro tamponado a 10%. O mesmo estudo mostrou que a pré-fixação com soluções fixadoras de base metanol/etanol seguida de pós-fixação com formol neutro tamponado a 10% (Wang) não altera a imunocoloração, mostrando haver elevada concordância entre o tecido e o citobloco fixados em formol e impregnados em parafina ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

O tempo de fixação das amostras citológicas, tal como o das amostras de tecido pode afetar a performance do ensaio LDT PD-L1 utilizando o clone 22C3 e plataforma Ventana Benchmark Ultra ⁽²⁷⁾

O painel de especialistas recomenda a utilização de FNT a 10% como fixador sempre que possível, tanto em amostras de tecidos como em amostras citológicas. Foi também sugerido por alguns especialistas, que a utilização de fixadores comerciais contendo metanol em material citológico, não afeta de forma significativa a imunocoloração PD-L1, pois permite a preservação proteica.

Fase-analítica

2: A adoção de plataformas automáticas de imunocoloração são uma garantia da qualidade analítica do teste PD-L1?

Enquadramento:

A automatização da IHQ substituiu com grande sucesso os procedimentos manuais ao uniformizar os protocolos e permitindo assim, aumentar consideravelmente a sensibilidade de deteção de pequenas concentrações de antígeno ⁽²⁵⁾.

Discussão:

Alguns estudos verificaram que as plataformas automáticas para IHQ disponíveis comercialmente podem originar resultados variáveis quer entre diferentes plataformas, quer entre si, mesmo quando o tecido de controlo está corretamente imunocorado ⁽⁴³⁾. Esta variabilidade pode ser uma potencial fonte de variação na sensibilidade clínica do teste PD-L1, podendo resultar em falso negativos ou falso positivos ⁽²⁵⁾. Torna-se assim necessário ter um conhecimento aprofundado das variáveis analíticas e da sensibilidade analítica e clínica da plataforma automática de IHQ em uso, para mitigar os resultados subótimos do teste PD-L1 ⁽²⁶⁾.

Ensaio LDT

O ensaio de diagnóstico Agilent PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, também com marca CE-IVD, permite padronizar o procedimento da IHQ para o PD-L1, e desta forma uniformizar os resultados do teste, apresentando melhores resultados quando comparado com os LDT ^(44,45). No entanto, nem todos os laboratórios têm a plataforma recomendada para o ensaio CE-IVD, como acontece na maioria dos **laboratórios portugueses**. Esta limitação tem sido ultrapassada pela maioria dos laboratórios portugueses, ao desenvolver um **ensaio LTD** que utiliza o **clone 22C3 em plataforma Ventana Benchmark Ultra e XT**. Neste caso, o ensaio LDT deve ter em vista a concordância dos resultados com os do ensaio com a marca CE-IVD ou com os de um centro de referência ⁽⁴⁶⁾ para obter a validação do mesmo ^(27,28).

De acordo com as recomendações do Colégio Americano de Patologistas, a validação dos ensaios LDT para biomarcadores preditivos deve basear-se na validação concordante de 20 testes com resultados positivos e 20 testes com resultados negativos conhecidos, nos quais se deve obter uma concordância superior a 90% ⁽⁴⁷⁾. O painel de especialistas recomenda a validação do ensaio no próprio laboratório, tornando-se essencial a monitorização da performance do ensaio LDT através de programas de avaliação de qualidade externa.

Variáveis analíticas

As principais variáveis analíticas que determinam o resultado do teste PD-L1 são afetadas pelas condições da recuperação antigénica, pelo fator de diluição do anticorpo primário, pelo sistema de deteção e cromogénio usados. A Tabela 2 mostra os parâmetros principais do protocolo de IHQ otimizados para a plataforma Ventana Benchmark Ultra para a determinação do teste PD-L1 por IHQ recomendado pelo NordiQC sem amplificação da imunocoloração ⁽⁴⁸⁾. A Tabela 3 mostra o protocolo em uso por um centro hospitalar representado no painel de especialista que usa amplificação da imunocoloração com bons resultados na determinação do PD-L1 quer em tecido quer em citobloco.

Tabela 2 - Parâmetros otimizados para o teste de IHQ do PD-L1 na plataforma Ventana Benchmark Ultra; adaptado de (NordiQC 2020) ⁽⁴⁸⁾.

Anticorpo primário	PD-L1, 22C3 Ref ^a M365329-2
Fator de diluição	1:40
Tempo de incubação / temperatura	60 min. / 37 °C
Solução de recuperação antigénica	Ventana Ultra CC1
Tempo e temperatura de recuperação antigénica	48 min. / 97 °C
Sistema de deteção	OptiView DAB IHC Detection Kit / 760-700
Tempo de incubação do anticorpo secundário	8 min.
Tempo de incubação do polímero	8 min.
Temperatura de incubação	37 °C
Cromogénio	OptiView DAB IHC Detection Kit / 760-700
Tempo de incubação / temperatura	8 min./ 37 °C
Intensificador da imunocoloração	CuSO4

Tabela 3 - Parâmetros otimizados para o teste de IHQ do PD-L1 na plataforma Ventana Benchmark Ultra em uso por um dos centros representados no painel de especialistas.

Anticorpo primário	PD-L1, 22C3 Ref ^a M365329-2
Fator de diluição	1:100
Tempo de incubação / temperatura	32 min. / 36 °C
Solução de recuperação antigénica	Ventana Ultra CC1
Tempo e temperatura de recuperação antigénica	32 min. / 100 °C
Sistema de deteção	OptiView DAB IHC Detection Kit / 760-700
Tempo de incubação do anticorpo secundário	8 min.
Tempo de incubação do polímero	12 min.
Tempo de incubação com amplificação	12 min.
Temperatura de incubação	37 °C
Cromogénio	OptiView DAB IHC Detection Kit / 760-700
Tempo de incubação / temperatura	8 min./ 37 °C
Intensificador da imunocoloração	CuSO ₄

Controlos de tecido

3: Que controlos de tecido devem ser utilizados para o teste PD-L1?

Enquadramento:

Os tecidos utilizados como controlos devem ter sido sujeitos a condições pré-analíticas iguais ao dos tecidos a testar e devem conter expressão dinâmica do antigénio de interesse.

Discussão:

A interpretação correta dos testes de IHQ e a identificação de resultados subótimos depende do uso de controlos *on-slide* e do controlo interno, caso este esteja presente ⁽⁴⁹⁾. Desta forma, é possível avaliar as condições da performance do teste e as fases pré-analítica e analítica, respetivamente.

Para avaliar o teste PD-L1, recomenda-se que sejam utilizados um controlo positivo e um controlo negativo *on-slide* adequados ao objetivo do ⁽⁵⁰⁾.

O **controlo do teste** deve providenciar uma representação dinâmica da imunexpressão do antigénio, devendo ser representativo das diferentes intensidades de imunocoloração devendo variar desde a ausência de marcação a marcação forte ⁽⁵¹⁾. Assim a amígdala palatina e a placenta são utilizadas como controlos positivos para avaliar a imunocoloração do PD-L1, ainda que a amígdala seja superior porque expressa diferentes intensidades de expressão de PD-L1. Nesse sentido, o controlo de amígdala palatina não deve expressar imunocoloração na maioria dos linfócitos da zona do manto e dos centros germinativos assim como na camada superficial do epitélio, deve expressar imunocoloração

membranas de intensidade fraca a moderada nos macrófagos presentes no centro germinativo e moderada a forte na maioria das células epiteliais das criptas amigdalinas ⁽⁵¹⁾.

Ainda que os controlos de tecido deem indicação sobre a performance do teste, Cheung *et al* observaram diferenças na uniformidade da imunocoloração dentro da área da lâmina histológica, tendendo a ser mais uniforme na metade superior da lâmina, junto à área identificativa e mais variável na metade distal ⁽⁴³⁾. Assim, os autores recomendam que os tecidos de controlo e o caso em estudo devam ser colocados por essa ordem na metade superior da lâmina, junto à área identificativa da lâmina ⁽⁴³⁾. Apesar dos controlos *on-slide* fornecerem informações relevantes sobre a performance do teste, é ainda assim possível ocorrerem resultados subótimos ou até incorretos.

O painel de peritos considera que os **programas de avaliação de qualidade externa** constituem uma ferramenta obrigatória para identificar parâmetros subótimos e providenciar pontos de melhoria ^(48,52).

Estas recomendações destacam os parâmetros críticos do teste de IHQ para a determinação da expressão do PD-L1 em CPNPC, salientando-se, no entanto, a importância da verificação dos ensaios LDT pelo Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica, antes de prosseguir para diagnóstico por forma a monitorizar a performance do teste.

A transição para IVDR

Enquadramento:

O Regulamento de Diagnóstico *In Vitro* (IVDR - EU 2017/746) substituirá a Diretiva de Diagnóstico *In Vitro* (IVDD - 98/79/EC) da União Europeia, tendo o objetivo de melhorar a qualidade dos testes providenciados nos laboratórios de diagnóstico. A utilização de ensaios de diagnóstico aprovados pela *Conformité Européenne in vitro diagnostic* (CE-IVD) será obrigatória.

Discussão:

A implementação do novo regulamento (IVDR - EU 2017/746) tem criado sérias preocupações nos laboratórios de Anatomia Patológica, pois impõe fortes restrições à utilização de ensaios LDT.

Dois ensaios de diagnóstico estão aprovados pela **CE-IVD** para o teste PD-L1 em CPNPC: o ensaio da **Roche Ventana PD-L1 (SP263)** e o ensaio da **Agilent PD-L1 IHC 22C3 pharmDx**. No entanto, na realidade portuguesa, a maioria dos laboratórios usa um **ensaio LDT**, utilizando um protocolo adaptado com o clone 22C3 na plataforma Ventana.

Com a entrada em vigor do novo regulamento, na maioria dos laboratórios portugueses, implicará a substituição do clone 22C3 pelo clone SP263 em plataformas Ventana para **dar cumprimento ao novo regulamento** com a disponibilização de um ensaio PD-L1 em

CPNPC com a marca CE-IVD ou, em alternativa, a utilização das plataformas Autostainer Link 48 ou Omnis Dako para ensaios utilizando o clone 22C3 com a marca CE-IVD. Esta transição poderá potencialmente afetar a *performance* do ensaio PD-L1 em CPNPC, podendo impactar na decisão terapêutica dos doentes oncológicos.

A maioria dos estudos demonstram a correlação entre os ensaios CE-IVD usando o clone 22C3 e SP263 ⁽⁵³⁻⁵⁶⁾, sugerindo que não existe a necessidade de utilização de diversos ensaios recorrendo a várias plataformas no mesmo laboratório. Adicionalmente, a viabilidade de utilização do clone 22C3 em plataforma VENTANA também demonstrou uma boa correlação ^(57,58).

De forma a avaliar o impacto que a transição de um ensaio LDT, que é utilizado maioritariamente em Portugal, para um ensaio CE-IVD, um estudo português prospetivo e multicêntrico avaliou o *score* PD-L1 (TPS) comparando os clones 22C3 (LDT) e SP263 (CE-IVD) em plataforma VENTANA em amostras pareadas de 391 CPNPC de 14 centros ^(59,60).

Foi observada uma concordância elevada entre o ensaio 22C3 LDT e o ensaio SP263 CE-IVD, sugerindo que não existirão disrupções significativas na transição do ensaio 22C3 LDT para o ensaio SP263 CE-IVD. No entanto, a validação, o controlo de qualidade, o treino e experiência são essenciais para uma correta implementação e bom *performance* do teste. Adicionalmente, a necessidade da utilização de programas de avaliação de qualidade externa é obrigatória para a monitorização regular da *performance* do ensaio, garantindo que a transição não afetará os resultados do teste PD-L1 em CPNPC.

- 1** Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, Coimbra, Portugal;
- 2** Ipatimup (Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto), Porto, Portugal;
- 3** Hospital CUF Descobertas, Lisboa, Portugal;
- 4** Hospital Garcia de Orta, EPE, Lisboa, Portugal;
- 5** Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, EPE, Lisboa, Portugal;
- 6** Centro Hospitalar Universitário do Algarve - Unidade de Portimão, Portugal;
- 7** Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, EPE, Porto, Portugal;
- 8** Hospital de Braga, EPE, Braga, Portugal;
- 9** Laboratório de Anatomia Patológica, Unilabs, Porto, Portugal
- 10** Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, EPE, Lisboa
- 11** Histicit, Porto, Portugal
- 12** Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, EPE, Porto, Portugal
- 13** Centro Hospitalar de S. João, EPE, Porto, Portugal
- 14** Unidade Local de Saúde de Matosinhos, EPE, Porto, Portugal
- 15** Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal, Madeira
- 16** Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca, EPE, Lisboa, Portugal;
- 17** Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, EPE, Lisboa, Portugal
- 18** Hospital do Espírito Santo de Évora, EPE, Évora, Portugal
- 19** Hospital Distrital de Santarém, Santarém, Portugal
- 20** Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE, Lisboa, Portugal
- 21** Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal
- 22** Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, EPE, Lisboa, Portugal
- 23** CEDAP (Centro de Diagnóstico Anátomo-Patológico), Coimbra, Portugal
- 24** Centro Hospitalar do Médio Tejo, EPE, Tomar, Portugal

Agradecimentos:

À AstraZeneca, por todo o apoio organizativo para a boa prossecução da reunião que esteve na base deste documento e, em particular, ao Dr. Ricardo Celestino pelas sugestões, críticas construtivas e revisão deste documento.

Email para correspondência: paulocmiranda@chuc.min-saude.pt

1 de novembro de 202

Bibliografia

1. Liu J, Chen Z, Li Y, Zhao W, Wu J, Zhang Z. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Oct 10];12:2339. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.731798/full>
2. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 Oct 10];27(8):1492–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27207108/>
3. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy—Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2022 Aug 24];18(24):6580–7. Available from: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article-abstract/18/24/6580/181547>
4. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2022 Aug 24];24(2):207–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791511001841>
5. Goode E, Smyth E. Immunotherapy for Gastroesophageal Cancer. *J Clin Med* [Internet]. 2016 Sep 22 [cited 2022 Aug 24];5(10):84. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/5/10/84/htm>
6. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Aug 29];15(4):499–519. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155608641933847X>
7. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2022 Aug 24];373(19):1803–13. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1510665>
8. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Nov 29 [cited 2022 Aug 24];379(22):2108–21. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1809615>
9. Eckstein M, Cimadamore A, Hartmann A, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, et al. PD-L1 assessment in urothelial carcinoma: a practical approach. *Ann Transl Med* [Internet]. 2019 Nov [cited 2022 Aug 24];7(22):690–690. Available from: <https://atm.amegroups.com/article/view/31922/html>
10. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 10 [cited 2022 Aug 24];375(19):1823–33. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1606774>

11. Udall M, Rizzo M, Kenny J, Doherty J, Dahm S, Robbins P, et al. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagn Pathol* [Internet]. 2018 Dec 9 [cited 2022 Oct 11];13(1):12. Available from: <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13000-018-0689-9>
12. Krohn DI. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual-NSCLC FDA-approved for in vitro diagnostic use. 2018;
13. VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Staining of Non-Small Cell Lung Cancer Interpretation Guide 2 VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Staining of Non-Small Cell Lung Cancer Interpretation Guide VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Staining of Non-Small Cell Lung Cancer Interpreta.
14. Krohn D, Technologies A. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual-Urothelial Carcinoma FDA-approved for in vitro diagnostic use.
15. Taylor CR. The Total Test Approach to Standardization of Immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2000 Jun 1 [cited 2022 Aug 24];124(7):945–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10888767/>
16. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue: How Well Do You Know Your FFPE Specimen? *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2022 Aug 24];138(11):1520–30. Available from: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/138/11/1520/128727/A-Review-of-Preanalytical-Factors-Affecting>
17. Garon JE. Patient safety and the preanalytic phase of testing. *Clin Leadersh Manag Rev* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2022 Oct 11];18(6):322–7. Available from: <https://europepmc.org/article/med/15597553>
18. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(11):1520–30.
19. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2012 Aug 30 [cited 2022 Aug 24];25(8):1098–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22460807/>
20. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Oct 23];15(4):499–519. Available from: <http://www.jto.org/article/S155608641933847X/fulltext>
21. van Seijen M, Brcic L, Gonzales AN, Sansano I, Bendek M, Brcic I, et al. Impact of delayed and prolonged fixation on the evaluation of immunohistochemical staining on lung carcinoma resection specimen. *Virchows Arch* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Aug 24];475(2):191–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-019-02595-9>

22. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, Berry AB, Birdsong GG, Bloom KJ, et al. Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Aug 24];143(11):1346–63. Available from: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/143/11/1346/433630/Preanalytics-and-Precision-Pathology-Pathology>
23. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: Issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(12):1929–35.
24. Cree IA, Booton R, Cane P, Gosney J, Ibrahim M, Kerr K, et al. PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2022 Aug 25];69(2):177–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27196116/>
25. Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, Sabalos C, Schechter N, Li X, et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol* [Internet]. 2016 Dec 8 [cited 2022 Aug 24];11(1):95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27717372/>
26. Thunnissen E, Allen TC, Adam J, Aisner DL, Beasley MB, Borczuk AC, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Aug 24];142(3):408–19. Available from: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/142/3/408/102892/Immunohistochemistry-of-Pulmonary-Biomarkers-A>
27. Vigliar E, Malapelle U, Iaccarino A, Acanfora G, Pisapia P, Clery E, et al. PD-L1 expression on routine samples of non-small cell lung cancer: results and critical issues from a 1-year experience of a centralised laboratory. *J Clin Pathol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Oct 25];72(6):412–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30846480/>
28. Hirsch FR. The IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry (IHC) Testing in Lung Cancer released [Internet]. 2017 [cited 2022 Aug 24]. p. 2–3. Available from: <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-pd-l1-testing-lung-cancer>
29. Kristensen T, Engvad B, Nielsen O, Pless T, Walter S, Bak M. Vacuum Sealing and Cooling as Methods to Preserve Surgical Specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2022 Oct 11];19(5):460–9. Available from: https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Fulltext/2011/10000/Vacuum_Sealing_and_Cooling_as_Methods_to_Preserve.14.aspx
30. Zarbo RJ. Histologic Validation of Vacuum Sealed, Formalin-Free Tissue Preservation, and Transport System. In: *Recent Results in Cancer Research* [Internet]. Springer New York LLC;

2015 [cited 2022 Oct 11]. p. 15–26. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13957-9_2

31. O'Malley DP, Yang Y, Boisot S, Sudarsanam S, Wang J-F, Chizhevsky V, et al. Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. *Mod Pathol* [Internet]. 2019 Jul 13 [cited 2022 Oct 29];32(7):929–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41379-019-0210-3>

32. Dako. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 50 tests for use with Autostainer Link 48 PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. 2015;1–12.

33. Paver EC, Cooper WA, Colebatch AJ, Ferguson PM, Hill SK, Lum T, et al. Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Oct 11];53(2):141–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33388161/>

34. Takigawa N, Ochi N, Yamane H. Histology versus cytology: PD-L1 testing in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Oct 25];7(S3):S225–7. Available from: [/pmc/articles/PMC6193914/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33388161/)

35. Stoy S, Rosen L, Murgu S. The Use of Endobronchial Ultrasound–guided Transbronchial Needle Aspiration Cytology Specimens for Programmed Death Ligand 1 Immunohistochemistry Testing in Non–Small Cell Lung Cancer. *J Bronchology Interv Pulmonol* [Internet]. 2017 Jul [cited 2022 Oct 25];24(3):181–3. Available from: <https://journals.lww.com/01436970-201707000-00001>

36. Hardy J, Bhatt N, Medford ARL. Suitability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration samples for programmed death ligand-1 testing in non-small cell lung cancer, the Bristol experience. *Asia Pac J Clin Oncol* [Internet]. 2022 Apr 18 [cited 2022 Oct 25];18(2):e32–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33870634/>

37. Iaccarino A, Salatiello M, Migliatico I, De Luca C, Gragnano G, Russo M, et al. PD-L1 and beyond: Immuno-oncology in cytopathology. *Cytopathology* [Internet]. 2021 Sep 6 [cited 2022 Oct 31];32(5):596–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33955097/>

38. Wang H, Agulnik J, Kasymjanova G, Wang A, Jiménez P, Cohen V, et al. Cytology cell blocks are suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Oct 27];29(6):1417–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29659668/>

39. Bozzetti C, Squadrilli A, Nizzoli R, Lagrasta C, Gasparro D, Majori M, et al. Optimizing PD-L1 evaluation on cytological samples from advanced non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Oct 31];12(3):183–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32066299/>

40. Gagné A, Wang E, Bastien N, Orain M, Desmeules P, Pagé S, et al. Impact of Specimen Characteristics on PD-L1 Testing in Non–Small Cell Lung Cancer: Validation of the IASLC PD-L1 Testing Recommendations. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Oct 25];14(12):2153–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32066299/>

25];14(12):2062–70. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086419331867>

41. 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* [Internet]. 2019 Jul 27 [cited 2022 Oct 25];127(7):470–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncy.22155>

42. Mei P, Shilo K, Wei L, Shen R, Tonkovich D, Li Z. Programmed cell death ligand 1 expression in cytologic and surgical non–small cell lung carcinoma specimens from a single institution: Association with clinicopathologic features and molecular alterations. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2019 Jul 26 [cited 2022 Oct 25];127(7):447–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/>

43. Cheung CC, Swanson PE, Nielsen S, Vyberg M, Torlakovic EE. Uneven Staining in Automated Immunohistochemistry: Cold and Hot Zones and Implications for Immunohistochemical Analysis of Biopsy Specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2018 May [cited 2022 Aug 25];26(5):299–304. Available from: https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Fulltext/2018/05000/Uneven_Staining_in_Automated_Immunohistochemistry_.1.aspx

44. Thunnissen E, Allen TC, Adam J, Aisner DL, Beasley MB, Borczuk AC, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Oct 27];142(3):408–19. Available from: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/142/3/408/102892/Immunohistochemistry-of-Pulmonary-Biomarkers-A>

45. Devices M, Search N, Hafp A, Kit T, Kit AH, Kit AH. Premarket Approval (PMA) [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 23]. p. 3–4. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P150013S017>

46. Lott RL, Riccelli P V., Sheppard EA, Wharton KA, Walk EE, Kennedy G, et al. Immunohistochemical Validation of Rare Tissues and Antigens With Low Frequency of Occurrence: Recommendations From The Anatomic Pathology Patient Interest Association (APPIA). *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Nov 1];29(5):327–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/>

47. Thunnissen E. How to Validate Predictive Immunohistochemistry Testing in Pathology? A Practical Approach Exploiting the Heterogeneity of Programmed Death Ligand-1 Present in Non–Small Cell Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Oct 23];143(1):11–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30307747/>

48. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 23]. p. 1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/>

49. Cheung CC, Taylor CR, Torlakovic EE. An Audit of Failed Immunohistochemical Slides in a Clinical Laboratory: The Role of On-Slide Controls. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*

- [Internet]. 2017 May [cited 2022 Oct 23];25(5):308–12. Available from: https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Fulltext/2017/05000/An_Audit_of_Failed_Immunohistochemical_Slides_in_a.2.aspx
50. Vyberg M, Nielsen S. Proficiency testing in immunohistochemistry—experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC). *Virchows Arch* [Internet]. 2016 Jan 26 [cited 2017 Aug 22];468(1):19–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26306713>
 51. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 31]. p. 1. Available from: <papers3://publication/uuid/2BB33C0E-3AA5-422F-9813-A8F2F380935A>
 52. Icc UKN. Uk Neqas Icc & Ish Performance Criteria [Internet]. [cited 2022 Oct 23]. Available from: <https://ukneqasiccish.org/modules/>
 53. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Oct 31];12(2):208–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27913228/>
 54. Marchetti A, Barberis M, Franco R, De Luca G, Pace MV, Staibano S, 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* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 Oct 31];12(11):1654–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28818609/>
 55. Sughayer MA, Alnaimy F, Alsughayer AM, Qamhia N. Comparison of 22C3 PharmDx and SP263 Assays to Test PD-L1 Expression in NSCLC. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Oct 31];27(9):663–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30024424/>
 56. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley M-B, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Oct 31];13(9):1302–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29800747/>
 57. Neuman T, London M, Kania-Almog J, Litvin A, Zohar Y, Fridel L, et al. A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana’s Platform. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016 Nov 13 [cited 2022 Oct 31];11(11):1863–8. Available from: <http://www.jto.org/article/S1556086416309315/fulltext>
 58. Lee JW, Zhang Y, Yoshizawa T, Argani P, Wood LD, Oshima K. Cancerization of ducts in hilar cholangiocarcinoma. *Virchows Arch* [Internet]. 2022 Aug 16 [cited 2022 Oct 31];481(2):1–10. Available from: <https://pmc/articles/PMC9379246/>
 59. Baptista D, Fernandes M, Sousa F, Garrido M, Pinho L, Morais R, et al. 34th European Congress of Pathology - Abstracts. *Virchows Arch* [Internet]. 2022 Sep 16 [cited 2022 Oct 31];481(S1):1–364. Available from: <https://pmc/articles/PMC9379246/>

60. News - VENTANA PD-L1 (SP263) Assay - LARVOL VERI [Internet]. [cited 2022 Oct 31]. Available from: https://veri.larvol.com/test_elements/ventana-pd-l1-sp263-assay/news

APTAP