

Desafios na avaliação de PD-L1: implementação da dupla marcação como controlo de qualidade em carcinoma de pulmão de não pequenas células

Ana Marques¹, Ana Rita Silvestre¹, Edite Figueira¹, Marisa Silva¹, Margarida Cardador¹, João Cruz², Mónica Ferreira²
¹ Técnicos de Anatomia Patológica, Cuf Descobertas Hospital; ²Anatomopatologistas, Cuf Descobertas Hospital

INTRODUÇÃO

O PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) é uma proteína de ligação ao PD-1 (*Programmed cell death protein-1*), cuja interação tem como objetivo modular a atividade de células T no tecido periférico, regulando a resposta inflamatória [1]. Esta proteína é expressa nomeadamente na placenta, algumas células epiteliais, macrófagos e células dendríticas [1]. A sobre-expressão de PD-L1 pelas células neoplásicas está associada a uma supressão da resposta imune no microambiente tumoral [1].

A avaliação da expressão desta proteína tem assumido um papel relevante na decisão terapêutica de doentes com carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC), sendo atualmente considerado um biomarcador preditivo de resposta ao tratamento, que parece ser eficaz em casos que apresentem expressão igual ou superior a 1% [2].

A implementação da técnica imuno-histoquímica (IHQ) para avaliação do PD-L1 tem apresentado inúmeros desafios, principalmente no que se refere à otimização dos anticorpos disponíveis, à utilização de diferentes plataformas para realização da técnica e à interpretação dos resultados, baseada na percentagem de células marcadas [2,3].

O facto de o PD-L1 ser expresso simultaneamente em células tumorais e macrófagos alveolares oferece algumas dificuldades na determinação da percentagem de células marcadas, essencial para a definição dos *cut-offs* para decisão terapêutica. Para tentar ultrapassar esta limitação, e sabendo que o CD68 utilizado em IHQ é uma glicoproteína expressa em macrófagos e monócitos, criou-se uma técnica de dupla marcação PD-L1/CD68, que visa evidenciar a marcação de PD-L1 nas células tumorais, diferenciando-a da marcação nos macrófagos alveolares.

OBJETIVO

Demonstrar a utilidade da dupla marcação PD-L1/CD68 na avaliação diferencial entre células tumorais de CPNPC e macrófagos alveolares, de forma a garantir a qualidade do diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Equipamento: Ventana Benchmark Ultra

Protocolo PD-L1/CD68: U IHC DS oDAB-uRed v4

1. Cortes de 3µm em lâminas adesivadas
 Controlo positivo- teste composto de amígdala e placenta

2. Estufa 60°C – 1h

3. Recuperação antigénica CC1 – 40'

4. Incubação – PD-L1 (a) 36'

5. Amplificação Optview 4' + 4'

6. Desnaturação 90°C – 4'

7. Recuperação antigénica CC1 – 72'

8. Incubação – CD68 (b) 28'

9. Amplificação (Amplifier A e B) -

10. Contraste com Hematoxilina 16'

11. Bluing 8'

(a) Anticorpo primário anti-PD-L1 – Dako, clone 22C3; diluição – 1/100

(b) Anticorpo primário anti CD-68 – ThermoScientific, clone PG-M1; diluição – 1/100

RESULTADOS

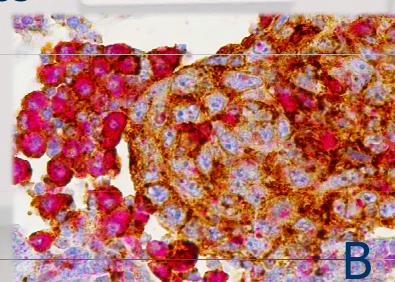
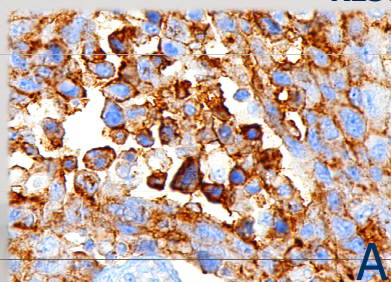
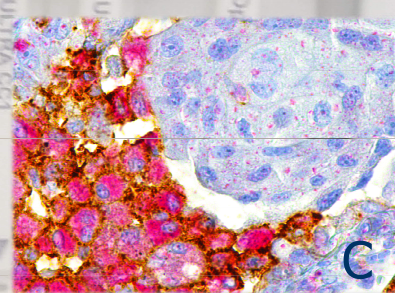


Figura 1: 3 casos de CPNPC (ampliação 600 x) **A-** Caso positivo para PD-L1, em que a marcação de células neoplásicas e macrófagos é PD-L1+ (castanha), com difícil distinção dos dois tipos celulares. **B** e **C-** Dupla marcação IHQ com PD-L1/CD68: células neoplásicas PD-L1+ e CD68- (castanhas); macrófagos CD68+ e PD-L1+ (castanhas e vermelhas), o que permite determinar inequivocamente a positividade (**B**) ou negatividade (**C**) dos casos para PD-L1.



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A determinação da expressão de PD-L1 na prática laboratorial é bastante recente e necessita de otimização. A standardização de métodos entre os diferentes centros de diagnóstico anatomopatológico é determinante, bem como a definição de controlos internos de qualidade que permitam uma maior fiabilidade nos resultados. A implementação da técnica de dupla marcação PD-L1/CD68 surge como uma nova abordagem que visa permitir uma melhor determinação da percentagem de células tumorais marcadas, contribuindo para um maior controlo de qualidade no diagnóstico de CPNPC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Patel, S; Kurzrock R. (2015); PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy, *Mol Canc Ther*; 14(4): 847-856;
- Neuman, T *et al* (2016) A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana's Platform; *J Thorac Oncol*; 11 (11): 1863–1868;
- Illie M, *et al* (2016); Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients, *Virchows Arch*; 468(5): 511-525