



Health Universitat de
Barcelona
Campus

'i) EU d'Infermeria



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TÍTOL DEL TREBALL
Impacto del tiempo de fijación de las
muestras en la determinación
Inmunohistoquímica del marcador
biológico PDL1.

Autora: Àngels Barberà Pla

Tutor: Tomás Santalucía Albí

Curs acadèmic 2016-2017

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	5
Antecedentes	
Estado actual del tema	
Justificación del proyecto	
3. Objetivos	10
4. Metodología	11
Diseño, muestra y tamaño de la muestra	
Variables, mediciones y recogida de datos	
Análisis estadístico y programario	
5. Aspectos éticos	15
6. Dificultades y limitaciones	15
7. Aplicabilidad y utilidad práctica. Implicaciones para la práctica clínica, la docencia, la gestión y la investigación	16
8. Presupuesto	17
9. Cronograma	18
10. Bibliografía	19
11. Anexos	21

1. Resumen

Objetivo principal: Definir, mediante un estudio experimental, los tiempos mínimo y máximo de fijación para las muestras que garanticen una determinación correcta de la expresión de PDL1.

Ámbito del estudio: Se trata de un estudio metodológico orientado a definir los criterios de calidad en los laboratorios de anatomía patológica para aquellos procedimientos inmunohistoquímicos de marcadores relacionados con la terapia antineoplásica dirigida.

Metodología: Estudio experimental con fragmentos de tejido amigdalario fresco, se estudiarán N=16 piezas obtenidas de 4 especímenes diferentes de forma paralela en condiciones idénticas y controladas con distintos tiempos de fijación (12, 24, 48 y 72 horas; N=16 para cada tiempo de exposición). Las muestras se marcarán con dos anticuerpos distintos (SP142 y SP263) en un diseño mixto 4x2 (muestras repetidas y grupos independientes) y los resultados serán valorados de forma ciega dicotómicamente (muestra correcta / incorrecta) según criterios predefinidos. El estudio estadístico será no paramétrico (tests de test de Friedman y McNemar).

Implicaciones para la práctica: Los resultados del experimento ayudarán a definir los circuitos adecuados de procesamiento de este tipo de muestras en el futuro.

Palabras clave: PDL1, amígdala, fijación de muestras, inmunohistoquímica.

Summary

Main objective: To define the time range for an adequate fixation of biopsic samples to determine PDL1 expression by means of a controlled experiment.

Scope: Methodologic study aiming to establish quality criteria in pathology departments in those processes related to the immunohistochemical identification of markers associated to targeted therapy.

Methodology: Fully experimental design using fresh tonsil fragments (sixteen samples obtained from 4 different specimens) and processed in parallel under identical conditions except for fixation time (12, 24, 48 and 72 hours; N=16 for each exposure period). Samples will be stained with two different commercial antibodies (SP142 and SP263) and evaluated in a mixed 4x2 design (repeated samples and independent groups). Results will be evaluated blindly by an independent observer and identified dichotomically as adequate or inadequate following predefined criteria. Statistical analysis will use non-parametric tests (Friedman and McNemar) for primary and secondary objectives.

Practical implications: The results of the experiment will help to define the adequate workflow circuits for quality processing of this specific kind of samples.

Key-words: PDL1, tonsil, sample fixation, immuhistochemistry.

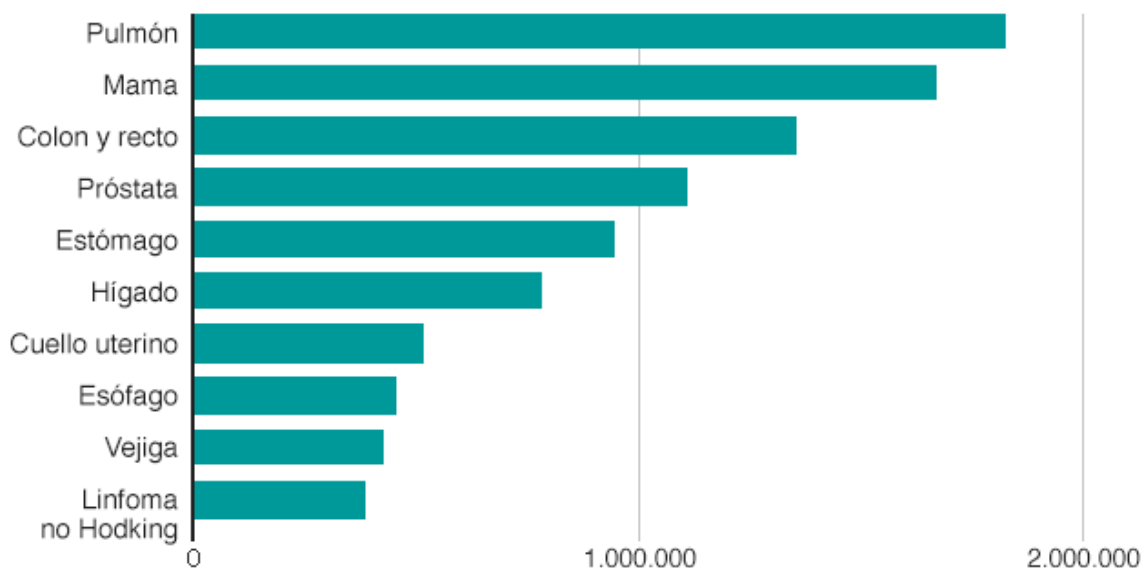
2. Introducción

Antecedentes

El cáncer es un problema de salud prioritario en el mundo debido a su elevada incidencia, prevalencia y mortalidad. Hoy viven en el mundo más de 32 millones de personas con cáncer y esta cifra va aumentando de año en año.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el número de nuevos casos de cáncer se incrementará en un 70% en los próximos 20 años. En España es la segunda causa de muerte.

10 tipos de cáncer diagnosticados más comúnmente



Fuente: Cancer Research UK, Globocan/ Cálculos de 2012

El cáncer de pulmón, en la mayoría de casos ligado al efecto cancerígeno del tabaco, sigue siendo la neoplasia más prevalente. En la actualidad en el mundo mueren alrededor de 1,6 millones de personas de cáncer de pulmón al año.

Se considera que el desencadenante inicial de los procesos neoplásicos es una mutación genética o más frecuentemente la suma de numerosas alteraciones genéticas, éstas o bien acelerarían la proliferación celular de forma no controlada o impedirían la muerte celular, lo que facilitaría la expansión clonal

de las células malignas. Las células malignas son capaces de interactuar con el medio ambiente en el que se encuentran para sobrevivir y seguir proliferando(7). Entre estas interacciones con el medio, cada vez se está dando más relevancia a los sistemas para eludir la vigilancia del sistema inmune.

El cáncer de pulmón puede originarse en distintos tipos de células presentes en el sistema respiratorio. Por sus diferencias en presentación y evolución clínica, histopatología y sensibilidad al tratamiento se suelen dividir en neoplasias de pulmón de célula pequeña (SCLC de las siglas en inglés) y el resto, de célula no pequeña (NSCLC). El NSCLC es el más prevalente y representa el 85% de las muertes por cáncer de pulmón (7).

El tratamiento del cáncer de pulmón no operable se ha limitado hasta hace poco a la quimioterapia y la radioterapia, tratamientos que no eran curativos y se usaban con intención paliativa (reducir el dolor y la sintomatología y retardar la progresión del cáncer). En estadios iniciales de la enfermedad la cirugía y la radioterapia podían llegar a ser curativas. En la mayoría de los casos los primeros síntomas y el diagnóstico de la enfermedad se realizaba cuando esta se encontraba en estados avanzados y ya estaba diseminada, con lo cual, las posibilidades de actuación eran muy limitadas (6). La identificación de alteraciones genéticas específicas ha llevado al diseño de fármacos dirigidos a inhibir dianas moleculares y encontrar tratamientos personalizados provocando un aumento significativo de la supervivencia de estos pacientes (15). Por ejemplo, los fármacos inhibidores de la tirosinquinasa han permitido que pacientes afectados por NSCLC con unas alteraciones genéticas concretas aumenten su esperanza de vida (6).

Más recientemente, la investigación se ha dirigido al estudio de los sistemas que desarrolla el tumor para escapar de la vigilancia inmune y al diseño de agentes inmunológicos que interfieran en estos mecanismos de escape (11). Entre ellos ha adquirido gran relevancia un sistema de moléculas de superficie celular conocidos globalmente como “puntos de control” (“checkpoint”) y anticuerpos desarrollados para bloquear dichas moléculas “checkpoint inhibitors”. Su eficacia en el tratamiento de enfermedades neoplásicas malignas

está siendo objeto de numerosos estudios científicos (11)

PDL1 (*Programmed cell death ligand – 1*)

PD1 (programmed cell death 1) y su ligando, PDL1 son dos moléculas clave en este proceso celular. PD1 se expresa en células T activadas, PDL1 es una molécula presente en la superficie de células del sistema inmune y de células neoplásicas como las del melanoma, el mieloma y algunos tipos de neoplasia pulmonar. La función normal de PDL1 es inducir tolerancia por parte de las células T activadas hacia las células del sistema inmune. Desafortunadamente la presencia de PDL1 en las células tumorales induce también tolerancia en las células T citotóxicas, encargadas de la destrucción de células malignas, hecho que facilita la progresión del tumor. Determinados tumores, entre ellos los NSCLC, expresan con frecuencia PDL1 y se considera que esta expresión es clave para eludir la acción de las células T citotóxicas presentes en el medio. Por tanto, el desarrollo de inmunoglobulinas capaces de bloquear la interacción entre PD1 y PDL1 mediante su unión a uno o el otro y que eviten el reconocimiento entre las células tumorales y los linfocitos T, debería reducir la tolerancia y permitiría al sistema inmune volver a atacar el tumor.

No queda claro si la sobreexpresión de PDL1 en tumores sólidos está ligada a su agresividad, pero sí que está comprobado que la supervivencia a 5 años de los pacientes con tumores que expresan PDL1 es significativamente inferior que la de los que no lo expresan (15). Diversos estudios (14) han demostrado la eficacia de inmunoglobulinas contra PD1 o PDL1 en pacientes con carcinoma de pulmón no de célula pequeña (NSCLC) que expresan esta molécula (16). Por este motivo, determinar en anatomía patológica si las muestras de NSCLC son positivas para PDL1 es un objetivo importante desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico.

Estado actual del tema

Existen distintas clonas comerciales de anticuerpos anti-PDL1 para realizar la determinación inmunohistoquímica. Cada una de estas clonas están ligadas a distintas plataformas de laboratorio y, a su vez, a la administración de fármacos

específicos (16). Existe un cierto desconcierto por la gran oferta de anticuerpos y plataformas disponibles, pero cada una de ellas está validada para un fármaco concreto. El hecho de que no todos los laboratorios dispongan de todas las plataformas puede limitar el uso de algunas de las clonas comercializadas. Por ello, algunos laboratorios han empezado a explorar la posibilidad de emplear distintas plataformas con otros anticuerpos reactivos, por ejemplo la plataforma de Ventana® con anticuerpos de DaKo®, o al revés (15).

Existen otros aspectos que todavía añaden mayor complejidad a la determinación inmunohistoquímica de PDL1. Desde el punto de vista analítico, se ha observado que PDL1 no solo se expresa de forma heterogénea en el tumor, sino que la expresión es dinámica, en otras palabras puede variar a lo largo del tiempo. Por tanto conviene definir en qué momento y qué extensión de tumor hay que estudiar para considerar la expresión como positiva o negativa y en qué grado.

Desde el punto de vista técnico también existen problemas preanalíticos, pues el procesamiento de la muestra puede afectar de forma importante a la intensidad de expresión (15), y la expresión de PDL1 es muy sensible al tiempo de fijación de la muestra. Las soluciones fijadoras tienen por objeto precipitar las proteínas, aumentar la consistencia de los tejidos, inactivar las enzimas proteolíticas e inhibir el crecimiento bacteriano y por lo tanto, preservar la constitución química y la morfología de los componentes tisulares. Sin embargo, un tiempo excesivo o insuficiente de fijación puede afectar a la fiabilidad de las determinaciones inmunohistoquímicas de algunas moléculas, específicamente PDL1.

Garantizar un tiempo de fijación óptimo para todas las muestras es un problema logístico para los laboratorios de anatomía patológica, donde las muestras llegan de forma no programada y en horarios no definidos. A menudo, las muestras se introducen en formol en el mismo quirófano y llegan al laboratorio con el proceso de fijación ya iniciado, y en otras, como en muestras peroperatorias, las muestras pueden llegar en fresco. Determinadas técnicas inmunohistoquímicas bien estandarizadas son suficientemente

robustas como para obtener resultados fiables tras un tiempo de fijación relativamente variable, este no es el caso en ciertos biomarcadores como PDL1(6).

Determinar el tiempo óptimo de fijación, así como otros aspectos del procesamiento e interpretación de los resultados de PDL1 es un reto importante para los laboratorios de anatomía patológica que implica a todo el equipo de profesionales: personal técnico, patólogos, responsables de calidad y al supervisor de enfermería, ya que un falso negativo va en detrimento de una indicación de tratamiento correcta. Por tanto, es responsabilidad de los gestores enfermeros del área quirúrgica y de los laboratorios de anatomía patológica garantizar su correcto procesamiento (6).

Justificación del proyecto

La aparición de tratamientos sobre dianas específicas está mejorando de forma importante el pronóstico de los pacientes con cáncer. Al mismo tiempo, es cada vez más importante identificar qué pacientes van a responder a uno u otro tratamiento. Sin embargo, el tratamiento individualizado, solo es factible si la caracterización de la neoplasia a nivel molecular es suficientemente fiable. El desarrollo de fármacos dirigidos contra PDL1 y PD1 ya es una realidad, sin embargo, desde el punto de vista de los servicios de diagnóstico, la determinación de estas moléculas en las muestras de biopsia no está completamente estandarizada. La existencia de una bibliografía creciente sobre el tema no ayuda a esta estandarización al estar fundamentada en plataformas de diagnóstico y anticuerpos específicos pero no necesariamente equivalentes. Es necesario un análisis riguroso y una evaluación objetiva de cada aspecto de los procesos preanalíticos, analíticos y post-analíticos para establecer procedimientos de trabajo normalizados que garanticen la fiabilidad de los resultados finales. El presente trabajo se centra en la evaluación de uno de los aspectos críticos para el diagnóstico, el proceso preanalítico de la biopsia.

La intención de este trabajo es definir, mediante un estudio experimental, los tiempos mínimo y máximo aceptables de fijación para las muestras en las que se va a determinar la presencia de PDL1.

3. Objetivos

Objetivo principal: Determinar el tiempo mínimo y máximo de fijación en formol de las muestras para tener resultados fiables de PDL1.

Objetivos secundarios:

- 1.- Determinar los tiempos óptimos de fijación dentro del mínimo y máximo aceptable, para distintas clonas de anticuerpo.
- 2.- Determinar los factores de la variabilidad intra e intermuestra.
- 3.- Comparar la fiabilidad y robustez (sensibilidad y especificidad) de los distintos anticuerpos para los diferentes tiempos de fijación.

4. Metodología

Diseño, muestra y tamaño de la muestra.

Este es un estudio cuantitativo experimental para el que se emplearán fragmentos de tejido amígdalar en fresco. El tejido amígdalar contiene células invariablemente positivas aunque con distinta intensidad de expresión y células negativas para PDL1 (17). La amígdala reproduce los gradientes de expresión inmunohistoquímica de forma muy similar a la del tejido pulmonar que se pretende evaluar en la siguiente fase del trabajo. Adicionalmente la amplia disponibilidad de tejido permitirá el procesamiento simultáneo y en las mismas condiciones de todas las muestras del estudio.

El tejido a estudiar serán 4 amígdalas provenientes de amigdalectomías aleatorias. Las piezas íntegras se transportarán en fresco desde el área quirúrgica, envueltas en una gasa humedecida en suero fisiológico en una tarrina de 500ml. De cada pieza amígdalar se obtendrán 16 secciones de 3 mm de grosor y un tamaño de 3 x 2 cm que se fijarán por separado en el volumen pertinente de formaldehído al 4% (formalina neutra al 10%) Neutral Buffer Formalin pH 7.2-7,4 (Diapath F0048) en una relación de volumen 10 a 1 fijador/muestra.(referencia) para garantizar una fijación óptima.

Las muestras se asignarán a tiempos de fijación de 12, 24, 48 y 72 horas (N=16 para cada tiempo de exposición). El tiempo de fijación en procesador (120 minutos) se sumará al tiempo global de fijación, por lo que las muestras se incluirán en el procesador tras 10, 22, 46 y 70 horas de fijación inicial fuera de procesador.

El procesamiento de las muestras se realizará de forma automática en un equipo Leica ASP 3000 S empleando el programa de procesamiento de "rutina diario", con una duración total de 14 horas a una temperatura controlada de 55°C. En este equipo se va a llevar a cabo una parte de la fijación junto con la deshidratación para poder realizar posteriormente la inclusión de la muestra. El proceso de deshidratación consiste en eliminar totalmente el agua del tejido a través de soluciones alcohólicas a distinta concentración y productos aclaradores para facilitar la impregnación del tejido en el medio de inclusión (parafina).

Para el proceso de deshidratación se emplearan los siguientes reactivos: Alcohol al 70%, 80%, 96% y 100%, Xilol y Parafina. El proceso de deshidratación estándar se detalla en el *anexo I*.

Las muestras procesadas se incluirán individualmente en bloques de parafina mediante un dispensador modelo Leica EG1150. A continuación se insertarán en una matriz de celdas mediante la técnica de Tissue-Microarray (modelo TMA-OM). El proceso completo se detalla en el *anexo II*. Brevemente, la técnica consiste en seleccionar áreas de la pieza original, obtener fragmentos “punch” con un instrumento específico, que se acomodan en un recipiente o bloque de celdillas (6 x 5 celdas), cada fragmento puede identificarse de forma única en las celdillas numeradas y los distintos fragmentos y muestras pueden evaluarse de forma simultánea y comparada.

Los cortes de tejido tendrán un grosor fijo de 3µm y se obtendrán con un micrótopo manual Leica RM2235. La tinción inmunohistoquímica se realizará empleando una plataforma cerrada de diagnóstico (Ventana Medical systems, Roche, Tucson AZ) en un inmunoteñidor (Benchmark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) que usa 30 procesadores individuales, con flujo de trabajo integrado y un acceso multimodal en tiempo real (*Anexo III*)

Para cada muestra y tiempo de fijación se emplearán dos anticuerpos monoclonales comerciales de dos clonas distintas VENTANA PD-L1 (SP142, Assay ref. 740-4859) y VENTANA PD-L1 (SP263, Assay ref. 790-4905) y con el Kit de detección OptiView (VMSI, Catalogo No. 760–700). Las plataformas y anticuerpos empleados tienen la aprobación FDA y CE y el procesado seguirá una instrucción de trabajo estándar del departamento de inmunohistoquímica para este tipo de técnica.

Los inmunoteñidores, procesadores, reactivos y procedimientos descritos disponen de los correspondientes certificados de calidad, calibraciones y controles.

Variables, mediciones y recogida de datos

La valoración de las muestras será realizada por un único observador experto ciego al procesamiento (tiempo de fijación y anticuerpos empleados) en un

microscopio Olympus binocular modelo CX31. El tejido amigdalario correctamente procesado presenta células invariablemente positivas con distintas intensidades y células negativas. Los macrófagos y linfocitos T del centro germinal son positivos para PD-L1 con una intensidad leve y moderada, por el contrario se espera fuerte tinción en algunas de las células escamosas del epitelio y negatividad para las células de la región interfolicular y del epitelio superficial. La valoración de cada muestra por el observador ciego se realizará según los criterios de la tabla 1. Esta tabla de valoración está validada y proporciona un grado de concordancia intra e inter-observador superior al 90% (18).

Tabla 1. Criterios de valoración de la muestra

Aceptable

- a) Positividad leve a PD-L1 en linfocitos y macrófagos del centro germinal y positividad difusa intensa en células epiteliales de la cripta reticular.
- b) Negatividad clara a PD-L1 en células inmunes de la zona interfolicular y en el epitelio escamoso superficial

Inaceptable

- a) Positividad de fondo inespecífica que dificulte la identificación nítida de la positividad de los linfocitos y macrófagos del centro germinal.
- b) Negatividad o positividad débil a PD-L1 en linfocitos y macrófagos del centro germinal.

Para considerar un resultado como correcto se deberán cumplir los dos criterios de aceptabilidad y no se deberán cumplir ninguno de los dos criterios de no aceptabilidad en al menos el 90% de los folículos valorables de la muestra.

Finalmente se obtendrán tres resultados para cada anticuerpo y tiempo de fijación (12 triplicados). Cada muestra se clasificará como correcta o incorrecta. Para poder considerar el experimento metodológicamente

correcto se espera una mínima variabilidad intramuestral con una concordancia cercana al 100% en los triplicados.

Análisis estadístico y programario

Para el cálculo del tamaño de la muestra se consideró que en base a la literatura disponible, con un tiempo de fijación adecuado la proporción de muestras correctas sería de 0.95 y la de muestras incorrectas 0.05. Adicionalmente, se consideró que una proporción de muestras incorrectas superior a 0.20 sería indicativo de un procedimiento de fijación o marcaje incorrecto. Con estas premisas se determinó que una N=64 piezas (N=16 para cada tiempo de exposición a comparar, N=32 para cada anticuerpo a comparar) sería suficiente para las comparaciones correspondientes al objetivo principal (comparación de los 4 tiempos de fijación) y secundario (comparación de los 2 anticuerpos). En cuanto al objetivo principal, en las condiciones de la hipótesis nula (proporción de muestras correctas superiores o iguales a 0.95, sin diferencias en cuanto a tiempo de exposición, la probabilidad de obtener 8/8 resultados correctos sería de 0.663 y la probabilidad de obtener 7/8 0.28, lo que proporciona una probabilidad simple de error alfa de 0.05 en caso de rechazo. Para aceptar la hipótesis nula se requerirían una o ninguna muestras inaceptables en todos los tiempos (N=16) por lo que el error beta asociado sería inferior a 0.14. Los contrastes de hipótesis se realizarán mediante pruebas no paramétricas adecuadas a cada objetivo específico.

Objetivo principal: definir el tiempo de fijación más adecuado para la evaluación de PDL1 en tejido amigdalal.

Hipótesis nula para el objetivo principal: el tiempo de fijación no influye en los resultados obtenidos. La proporción de muestras correctamente teñidas será la misma para las muestras fijadas 12 h, 24 h, 48 h o 72 h. La hipótesis nula se evaluará mediante un test de Friedman para muestras repetidas (N=16, cuatro repeticiones).

Objetivo secundario: Comparar la robustez de los resultados de los dos anticuerpos en cada tiempo de fijación, particularmente para los tiempos de fijación extremos.

Hipótesis nula para el objetivo secundario: ambos anticuerpos son igualmente robustos en cualquier tiempo de fijación. La hipótesis nula se evaluará mediante un test de McNemar para el conjunto de tiempos y para cada tiempo de fijación.

Para el procesamiento estadístico de la matriz de datos se empleará el paquete estadístico R version 3.0.1 (19).

5. Aspectos éticos

Las muestras empleadas estarán dissociadas de los datos identificativos de los pacientes, solo se emplearán muestras de pacientes que previamente donen sus muestras voluntariamente y por escrito al biobanco del centro. El proyecto será presentado a la dirección de centro para su aprobación. Aunque los pacientes propietarios de las muestras no sean sometidos a ningún procedimiento relacionado con el estudio ni se requiera acceder a sus datos o historial clínico, el proyecto se presentará también al CEIC del hospital. Las muestras utilizadas quedaran registradas en el biobanco del hospital que conservará el consentimiento informado de los pacientes. *(Anexo IV)*

6. Dificultades y limitaciones

El estudio pretende determinar los tiempos óptimos de fijación para la técnica de determinación de PD1 empleando dos de las clonas comercializadas en el momento actual y una única plataforma de procesamiento que es la empleada en nuestro centro (Roche Ventana®). Existen otras clonas y otras plataformas comercializadas y no se puede garantizar que nuestros resultados sean completamente extrapolables a todos ellos. Adicionalmente, es probable que sigan apareciendo nuevas plataformas y anticuerpos monoclonales que sean más robustos y fiables que los actuales, con lo cual los márgenes de tiempos de fijación recomendados en el presente trabajo quizá puedan flexibilizarse en el futuro. El estudio se ha hecho en tejido amigdalario por ser el idóneo para establecer el impacto del tiempo de fijación y eliminar variables no deseadas. Sin embargo, el objetivo final una vez completado el presente estudio, es estudiar muestras clínicas de neoplasias pulmonares, ya que por el momento no se puede garantizar que los resultados obtenidos en amígdala sean

exactamente extrapolables a estas muestras, de tamaños y métodos de obtención más heterogéneos.

7. Aplicabilidad y utilidad práctica. Implicaciones para la práctica clínica, la docencia, la gestión y la investigación

Los resultados de este proyecto son importantes para la estandarización del proceso preanalítico de las muestras candidatas a la determinación de PDL1. Estos resultados determinarán las condiciones adecuadas de obtención y procesamiento que se debería exigir a las unidades quirúrgicas, endoscópicas y a los laboratorios de anatomía patológica con el fin de garantizar resultados correctos en la determinación de PDL1. La determinación de los tiempos máximos de fijación y la fiabilidad de cada anticuerpo en circunstancias distintas son datos de importancia crítica en la implementación de circuitos de calidad en el campo del diagnóstico de la patología maligna pulmonar. Posteriormente, estos circuitos serán extensibles a otros tipos de neoplasias donde la determinación de PD1 va adquiriendo importancia (neoplasias de vías urinarias, melanoma y neoplasias hematológicas).

8. Presupuesto

El presupuesto incluye la obtención de muestras del biobanco y el total del proceso experimental. El personal técnico, estadístico y el patólogo ciego evaluador forman parte del equipo investigador y no recibirán compensación económica por su participación en el estudio.

PRESSUPOST PREVI A LA REALITZACIÓ DE SERVEIS

Pressupost nº:	AP-154	Plataforma:	Histopatología y Microscopía electrónica	Data:	03/05/2017
-----------------------	---------------	--------------------	---	--------------	-------------------

VALORACIÓ ECONÒMICA						
<i>Referència</i>	<i>Descripció</i>	<i>Unitats</i>	<i>Tarifa*</i>	<i>Cost unitat</i>	<i>Import €</i>	
VPLHIST00	Cerca i retorn de blocs de l'arxiu	4	1	2	8€	
PHM*0001	Realizació de bloc de parafina	32	1	3.50	112	
VPLHIST00	Tissue array amb teixit fragmentat 96cores	1	1	332	332€	
VPLHIST00	Talls de TMA's	3	1	2.20	6.6€	
PHM*0027	Tinció HE(sense tall)	1	1	2	2€	
VPLHIST00	IHQ sense Ac del investigador	2	1	25	50€	
Vigència del				Subtotal €		510.6€
				Descompte €		
				Total sense IVA €		510.6€

* Tarifes. 1: IGTP; 2: Campus Can Ruti, 3: Extern Públic, 4: Extern Privat

El pressupost inclou el servei, el material fungible necessari i l'anàlisi primària de resultats. El temps de resposta serà el convingut amb l'usuari.

Us agràiem que ens retorneu, via correu electrònic o en mà, una còpia signada en concepte d'acceptació del pressupost.

9. Cronograma

Actividades	Junio 2017	Julio 2017	Agosto 2017	Septiembre 2017	Octubre 2017	Noviembre 2017	Diciembre 2017	Enero 2018	Febrero 2018	Marzo 2018	Abril 2018	Mayo 2018	Junio 2018
Recogida de la muestras													
Elaboración del bloque de parafina													
Realización del TMA													
Determinación de PDL1													
Valoración del PDL1 por el patólogo													
Análisis estadístico													
Redacción, revisión y publicación													

10. Bibliografía

1. Ameratunga M, Asadi K, Lin X, Walkiewicz M, Murone C, Knight S, et al. PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Resected NSCLC. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153954.
2. Borczuk AC, Allen TC. PD-L1 and lung cancer: The era of precision-ish medicine? *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(4):351–4.
3. Cagle P. Challenges to BM testing for PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors. 2015;139(Dec):1477–8.
4. Chakravarti N, Prieto VG. Predictive factors of activity of anti-programmed death-1/programmed death ligand-1 drugs: immunohistochemistry analysis. *Transl lung cancer Res*. 2015;4(6):743–51.
5. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2015;89(2):181–8.
6. 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*. 2016;1–10.
7. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–7.
8. Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria J-C, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch*. 2016;468:511–25.
9. Kerr KM, Hirsch FR. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(4):326–31.
10. Kerr KM, Nicolson MC. Non–Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:259-64.

11. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, Utsumi H, Kanda S, Horinouchi H, et al. Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. Elsevier Inc.; 2015;16(5):385–90.
12. Montironi R, Santoni M, Tartari F, Lopez-Beltran A, Cheng L, Berardi R, et al. Testing PD-1/PD-L1 Expression in Cancer Therapy: Pathologic Insights and Economic Sustainability. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(6):501–2.
13. Pan Z-K, Ye F, Wu X, An H-X, Wu J-X. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis*. 2015;7(3):462–70
14. Shames DS, Wistuba II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol*. 2014;232(2):121–33.
15. Lynette M, Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT, et al. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry-A new challenge for pathologists: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:341–4.
16. Song Z, Yu X, Cheng G, Zhang Y. Programmed death ligand 1 expression associated with molecular characteristics in surgically resected lung adenocarcinoma. *J Transl Med*. BioMed Central; 2016;1:1–7.
17. Sun WY, Lee YK, Koo JS. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *J Transl Med*. BioMed Central; 2016;14(1):173-185.
18. Smith J, Robida MD, Acosta K, Vennapusa B, Mistry A, Martin G, et al. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagn Pathol*. Diagnostic Pathology; 2016;11(1):44.
19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2013. URL <http://www.R-project.org/>.

11. Listado de Anexos

Anexo I. Proceso de deshidratación de las muestras.

Anexo II. Técnica de Tissue- Array.

Anexo III. Manual del inmunoteñidor Benchmark Ultra

Anexo IV. Consentimiento informado del biobanco

Consentimiento para la utilización de material biológico sobrante de la asistencia y los datos clínicos asociados para investigación

En el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (HUGTP), igual que en la mayoría de hospitales, además de la tarea asistencial, también se hace investigación. Las muestras que se obtienen para el diagnóstico o tratamiento de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, aún pueden ser útiles y necesarias para la investigación de cara a mejorar el conocimiento sobre las enfermedades y conseguir su posible curación.

Por esto, le solicitamos la autorización para utilizar la información clínica y el material biológico **sobrante** de las pruebas que, como parte de la asistencia normal, le hayan hecho o le harán en el HUGTP, sin que esto le cause ninguna molestia ni riesgo adicionales. **En ningún caso le practicarán más pruebas de las necesarias ni tampoco ninguna prueba experimental.**

En el caso que dé su autorización, este material biológico pasará a formar parte del banco de muestras biológicas del hospital, denominado Biobanco IGTP-HUGTP. Aun así, usted o su familia podrán disponer de las muestras cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que aún estén disponibles.

En cualquier caso, usted (los menores de edad, mediante su tutor o representante legal) podrá ejercer sus derechos de consulta, rectificación, cancelación u oposición, y también obtener información sobre los proyectos de investigación en los que se hayan utilizado sus muestras dirigiéndose a:

Responsable del fichero del Biobanco IGTP-HUGTP

Fundación Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias i Pujol
Carretera de Can Ruti. Camí de les Escoles s/n
08916, Badalona. España
Tel. 93 497 8653 / 8658
Dirección electrónica: biobanc@igtp.cat; igtp@igtp.cat

Las muestras cedidas solamente podrán ser utilizadas con finalidad de investigación biomédica, en estudios aprobados siempre por el Comité de Ética de la Investigación del HUGTP y de acuerdo con las leyes actuales. Se codificarán las muestras para su utilización y los datos clínicos asociados estarán custodiados de acuerdo con la legislación vigente con tal de garantizar la confidencialidad. En el caso de que las muestras no se hayan anonimizado, solamente tendrán acceso a los datos personales los investigadores y las personas autorizadas que garanticen su confidencialidad.

El Biobanc podrá ceder los datos y muestras a investigadores de otros centros, pero siempre de forma anónima. La cesión tendrá que ser aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica. La cesión de muestras biológicas que usted hace al Biobanco es gratuita y voluntaria.

En algunos casos se realizarán estudios genéticos con las muestras donadas, a partir de las cuales se puede obtener información relevante para su salud y la de sus familiares. En este caso, nos pondremos en contacto con usted mediante los datos que figuren en su historial clínico. Naturalmente, se respetará su derecho a decidir que no le comuniquen los resultados de la investigación en la cual se hayan utilizado sus muestras.

Si usted decide firmar este consentimiento, también podrá revocar-lo libremente en cualquier momento solicitándolo al responsable del fichero del Biobanco IGTP-HUGTP o a su médico de referencia en el hospital. La revocación del consentimiento no tiene ninguna repercusión negativa en la asistencia sanitaria que usted recibe o pudiese recibir. En el caso de revocación, se destruirán sus muestras depositadas en el Biobanc y los datos asociados. En caso de aceptación, se conservaran indefinidamente hasta su extinción.

En caso de cierre del Biobanco IGTP-HUGTP, la información sobre la destinación de sus muestras estará a su disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica.

Autorizo al Biobanco IGTP-HUGTP a almacenar y utilizar tanto la información clínica de mi historial médico como el material biológico sobrante de las pruebas que me han hecho o que me tienen que hacer, con la finalidad de realizar proyectos de investigación, incluyendo su utilización en investigaciones internacionales, **con las siguientes restricciones:**

Describa las restricciones aquí _____ Sí NO

Deseo que me sean comunicados los resultados de la investigación **importantes** para mi salud o la de mi familia Sí NO

Firma del paciente (NHC)

Profesional que informa:

Sr/Sra NIF.....

Sr/Sra

o tutor o representante legal (si tiene menos de 12 años)

Núm. de colegiado

Sr/Sra NIF.....

Badalona, de de 20