

ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE qRT-PCR E INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES ESTÁNDAR EN CÁNCER DE MAMA: VALIDACIÓN EN EL ENSAYO CLÍNICO GEICAM 9906.

M. Martín, A. Ruíz, C. Davis, M. Ruíz Borrego, Inge J. Stijleman, V. Furió, Ch. M. Perou, A. Rodríguez-Lescure, JM López-Vega, Philip S. Bernard

Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

Instituto Valenciano de Oncología (IVO) de Valencia

University of Utah Health Sciences Center/ Huntsman Cancer Institute, Salt Lake City, Utah, USA

Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid

Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, USA

Hospital General Universitario de Elche, Alicante

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander

ANTECEDENTES

- *La determinación mediante IHQ/FISH de RE, RPg, HER2 y Ki67 es una rutina diagnóstica considerada imprescindible para sentar el pronóstico y diagnóstico de los cánceres de mama*
- *El PAM50 Intrinsic Classifier, es una firma genética basada en qRT-PCR, que permite:*
 - *Identificación de los subtipos intrínsecos*
 - *Analizar cuantitativamente la expresión de 49 genes, incluyendo RE, RPg, her2 y Ki67*
 - *Determinar la expresión de metagenes (proliferación, luminal) con significado pronóstico y quizás predictivo.*

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

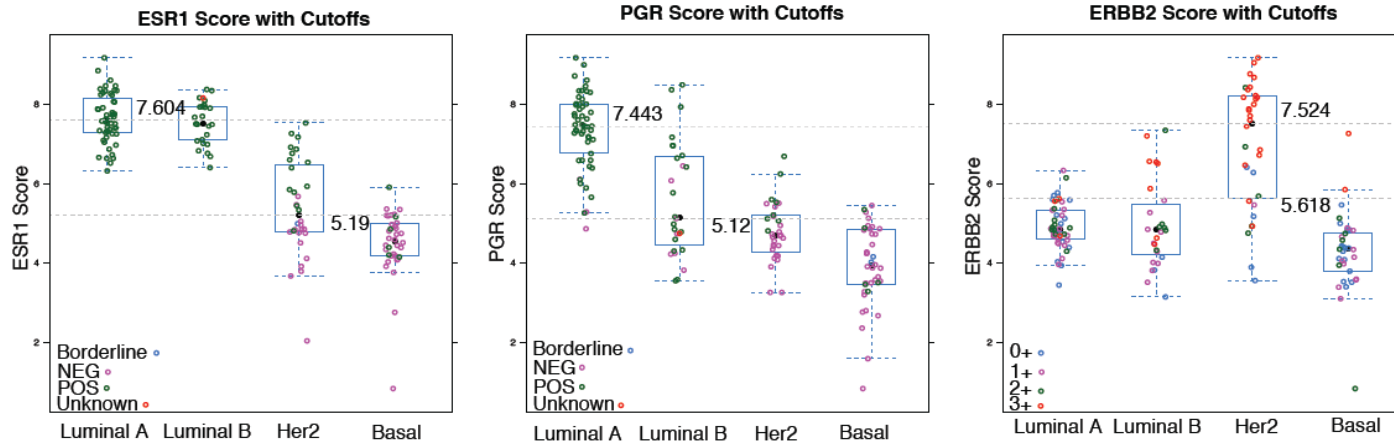
➤ Comparación de los resultados obtenidos con técnica convencional (IHQ/FISH) y técnica de qRT-PCR (PAM50 Intrinsic Classifier) en el análisis de:

- Receptores de estrógenos
- Receptores de progestágenos
- HER2
- Ki67

➤ Muestra: 154 tumores de la Universidad de Utah, 793 tumores procedentes del estudio GEICAM 9906,

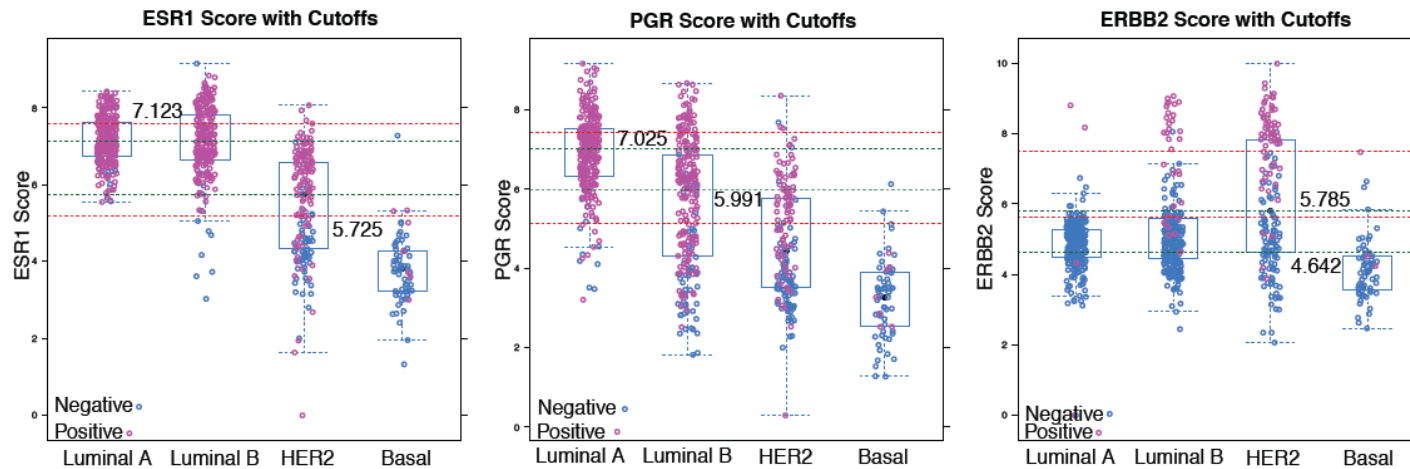
METODOLOGIA

1. Análisis por IHQ/FISH de todos los tumores
2. Análisis cuantitativo de la expresión génica (RNA tumoral, PAM50)
3. Clasificación en Subtipos moleculares (algoritmo clínico PAM50)
4. Selección de los Puntos de Corte (Bajo/ Intermedio/ Alto) aplicados a los datos de qRT-PCR mediante una aproximación basada en la distribución de estos biomarcadores en muestras representativas de los subtipos (LumA/B, HER2, basal-like) en 154 tumores (training set).
5. Aplicación de los puntos de corte a los resultados de qRT-PCR de los tumores GEICAM 9906 (validation set).
6. Análisis comparativo de qRT-PCR e IHQ/FISH mediante Curvas ROC (Receiver Operator Characteristic)
 - ✓ Comparación de qRT-PCR-PAM50 (Bajo vs. Intermedio-alto) vs. IHQ (Negativo vs. Positivo)
 - ✓ Optimización de la Sensibilidad y Especificidad para cada biomarcador



Se analizaron los resultados de expresión génica mediante qRT-PCR en 146 tumores (Training Set) para los genes *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, y Luminal, y se determinaron los puntos de corte (bajo/ intermedio/ alto) para estos biomarcadores, basándose en la distribución de la expresión de estos marcadores en los diferentes subtipos (Luminal A, Luminal B, HER2 y Basal)

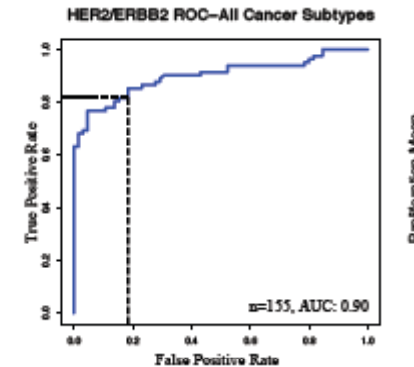
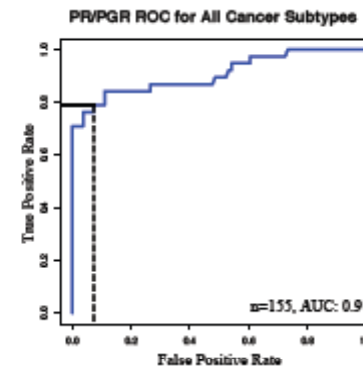
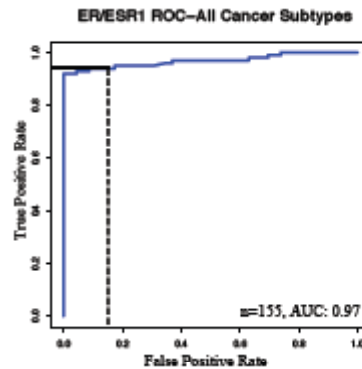
Genes/	Puntos de Corte			
	BAJO	INTERMEDIO	ALTO	
ESR1 (ER)	0 - 5.2	>5.2 - 7.6	>7.6 - 10	Alto <i>ESR1</i> = valores superiores a la media de expresión en Luminal A.; Bajo <i>ESR1</i> = valores inferiores a la media de expresión en HER2+
PGR (PR)	0 - 5.1	>5.1 - 7.4	>7.4 - 10	Alto <i>PGR</i> = superiores a la media en Luminal A. Bajo <i>PGR</i> = inferiores a la media en Luminal B
ERBB2 (HER2)	0 - 5.6	>5.6 - 7.5	>7.5 - 10	Alto <i>ERBB2</i> = superiores a la media en HER2+ Bajo <i>ERBB2</i> = inferiores al cuartil inferior de HER2+



Se establecieron los puntos de corte para cada biomarcador en los tumores del ensayo GEICAM 9906 (Validation Set) basados en la distribución de los resultados de qRT-PCR, y mostraron una buena correlación con los observados en la población inicial (146 tumores).

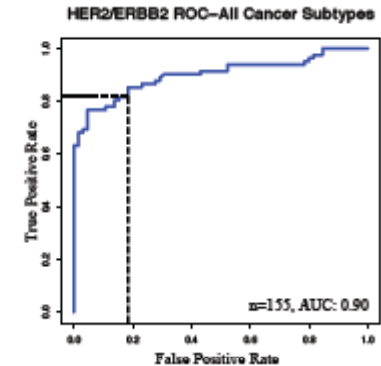
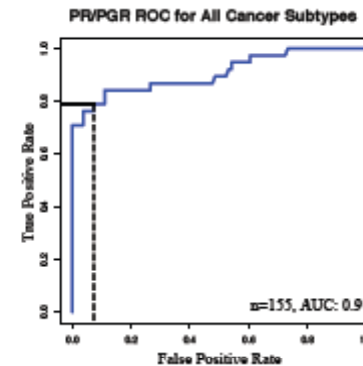
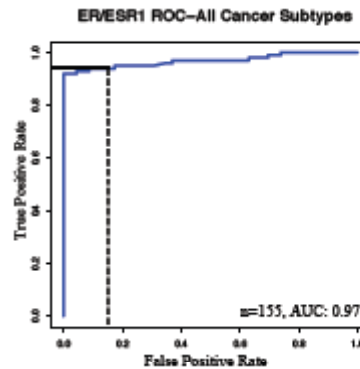
ANÁLISIS CURVAS ROC (Receiver Operator Characteristic)

La comparación de resultados de qRT-PCR vs IHQ/FISH dio un valor aceptable de área bajo la curva (AUC \geq 0.89) para *ESR1*/RE, *PGR*/RP, y *ERBB2*/HER2

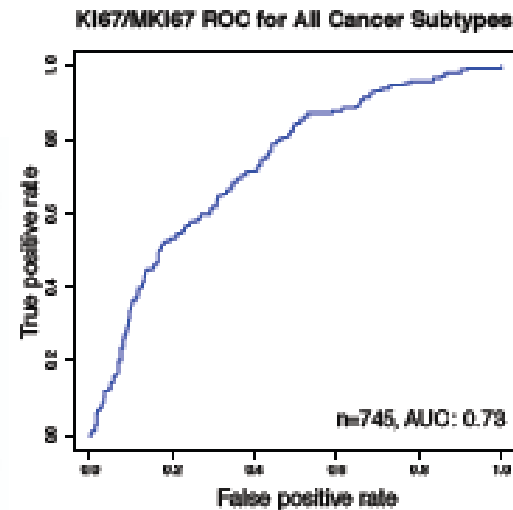


ANÁLISIS CURVAS ROC (Receiver Operator Characteristic)

La comparación de resultados de qRT-PCR vs IHQ/FISH dio un valor aceptable de área bajo la curva ($AUC \geq 0.89$) para *ESR1*/RE, *PGR*/RP, y *ERBB2*/HER2



Esta correlación fue notablemente menor para Ki67, EGFR y CK5/6.



ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

	Precisión			
		Área Bajo la Curva (AUC)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Expresión Gen/ Proteína	ESR1/RE	0.89	96	72
	PGR/ RP	0.9	83	86
	ERBB2/HER2	0.95	92	87
	MKI67/ki67	0.74	71	62
	EGFR/ EGFR	0.82	80	71
	KRT5/ck5/6	0.61	61	53

- La especificidad y sensibilidad de RE, RPg y HER2 fueron correctas, con una correlación considerada aceptable.
- Otros biomarcadores analizados (ki67, EGFR, y ck5/6) presentaron un grado de correlación bajo, debido quizá a la menor estandarización en el análisis de estas determinaciones.

CONCLUSIONES

- El test clínico de PAM50 (qRT-PCR) ó sólo identifica con alta precisión y reproducibilidad los subtipos biológicos de cáncer de mama, sino que aporta una cuantificación de biomarcadores analizados de forma rutinaria en la práctica clínica (i.e. RE, RP, HER2)
- Existe una correlación razonablemente precisa entre IHQ/FISH y qRT-PCR para los RE y RPg y HER2
- La correlación entre expresión génica (qRT-PCR) e IHQ para otros biomarcadores es mucho más pobre (por ejemplo, Ki67, EGFR, CK 6/7)

AGRADECIMIENTOS

- A Rosalia Caballero Ph.D (GEICAM), por su inestimable ayuda en la preparación de la presentación
- A María José Escudero y Maribel Casas, bioestadísticas de GEICAM, por su trabajo en el análisis de datos

