

# Expresión inmunohistoquímica de la proteína mycN y el estado del gen MYCN en tumores neuroblásticos

## *Immunohistochemistry expression of mycN protein and MYCN gene status in neuroblastic tumors*

Marta Piqueras Franco, Rosa Noguera Salvá, Julia Cruz Mojarrieta, Manish Mani Subramaniam, Victoria Castel Sánchez<sup>1</sup>, Antonio Llombart-Bosch, Samuel Navarro Fos

### RESUMEN

**Antecedentes:** Los tumores neuroblásticos son de los tumores pediátricos más frecuentes. A pesar de su gran variedad genética, clínica e histopatológica, la amplificación del gen MYCN es siempre un indicador de mal pronóstico. Este oncogen codifica una proteína nuclear que se une al ADN y activa la transcripción de sus genes diana. Un aumento en el número de copias del gen no se corresponde siempre con sobreexpresión de su proteína. El valor pronóstico de la detección de la proteína es controvertido. **Métodos:** Se han analizado 220 muestras de NB. Mediante la técnica de FISH se ha establecido el estado del gen, mientras que la inmunohistoquímica ha permitido el estudio de la expresión de la proteína en secciones de parafina. **Resultados:** Los 15 casos con ganancia y 140 de los 141 casos sin amplificación del gen MYCN no expresan la proteína. En el grupo de los 55 casos amplificados, el 76,4% han sido positivos y 23,6% negativos. **Conclusiones:** Los niveles de expresión génica no siempre corresponden con el número de copias del gen, ya que intervienen muchos mecanismos moleculares. La mayoría de los casos positivos para este anticuerpo presentan amplificación, así que el estudio inmunohistoquímico de su expresión podría utilizarse para aproximar el estado del gen MYCN en aquellos laboratorios de diagnóstico donde las técnicas moleculares no estén disponibles.

**Palabras clave:** Neuroblastoma, proteína mycN, gen MYCN.

### SUMMARY

**Introduction:** Neuroblastic tumors are one of the most frequent pediatric tumor. Despite their genetic, clinic and histopathologic variety, MYCN gene amplification is always considered as an adverse prognosis factor. MYCN gene encodes a nuclear protein which binds DNA and activates target genes transcription. An increase of gene copies number not always involves a protein overexpression. The prognostic value of the determination of mycN protein is controversial. **Materials and methods:** 220 NB samples were analyzed. We established the gene status by FISH and we studied the protein expression in paraffin sections by immunohistochemistry. **Results:** 15 gain samples and 140 from 141 non-amplified samples don't express MYCN protein. From 55 amplified cases, 76.4% were positive and 23.6% were negative. **Conclusions:** Gene expression levels do not always match with gene copies number due to different molecular mechanisms. Most of positive cases to mycN protein are amplified samples. This antibody could be used to approach gene status in those laboratories without available molecular techniques.

**Key words:** Neuroblastoma, mycN protein, MYCN gene.

*Rev Esp Patol 2007; 40 (2): 97-102*

### INTRODUCCIÓN

Los tumores neuroblásticos se encuentran entre los tumores sólidos pediátricos más frecuentes. Son tumores que se presentan con una gran heterogeneidad clínica, genética e histopatológica. Hay diferentes tipos (clínicos, histológicos y genéticos) porque hay diversos factores extracelulares y celulares implicados que pueden generar

esa situación. La edad media de diagnóstico son 2 años, aunque casi la mitad de los casos se diagnostican en niños menores de 1 año, con diferentes manifestaciones clínicas y de evolución muy variable (1). Los neuroblastos son células migratorias de la cresta neural que formarán, entre otras estructuras, las cadenas ganglionares simpáticas, la médula suprarrenal y los paraganglios. En condiciones normales, la mayor parte de ellos muere por

Recibido el 21/4/06. Aceptado el 14/9/06.

Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia. Blasco Ibáñez, 15. Valencia. 46010. Valencia. España.

<sup>1</sup> Oncología Pediátrica, Hosp. Universitario La Fe, València.

[moguera@uv.es](mailto:moguera@uv.es)

apoptosis entre la 26.<sup>a</sup> y 40.<sup>a</sup> semana de gestación; el resto sufre un proceso de diferenciación dando lugar a neuronas post-ganglionares y/o células neuroendocrinas (1). Pero si los neuroblastos no se diferencian completamente ni tampoco mueren, entonces se puede desarrollar un neuroblastoma.

El factor biológico pronóstico por excelencia es el estado del gen MYCN. Brodeur y Seeger (2) establecieron la relación entre la amplificación del gen (alto número de copias) y un pronóstico desfavorable. Desde entonces, su análisis mediante diversas técnicas como Southern Blot (SB), Polymerase Chain Reaction (PCR), Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), es un criterio, junto con edad, estadio e histopatología, para decidir el tratamiento más eficaz. Desde un punto de vista molecular, el aumento en el número de copias de un gen provoca un aumento de su transcripción y, por tanto, de los niveles de ARNm; mayor cantidad de ARNm implica más traducción y un aumento de la proteína codificada por ese gen; y el aumento de esta proteína podría explicar algunos efectos de la amplificación del gen. El gen MYCN codifica 2 proteínas inestables y nucleares. En realidad son 2 isoformas que tienen puntos de inicio de la traducción diferentes. Son fosforiladas por el enzima CKII y acaban pesando entre 58 y 64 kDa (3). El extremo C terminal presenta 3 zonas diferenciadas: BR (zona de unión al ADN), HLH (zona de interacción con otras proteínas mediante la conformación hélice-vuelta-hélice) y Zip (zona con residuos de leucina). El extremo N terminal presenta una zona de unión al ADN para activar la transcripción. Se ha demostrado que las mutaciones, cambios o deleciones en el extremo C terminal (zonas de unión a proteínas como Max) reducen el potencial oncogénico de la proteína (4,5) ya que necesita formar heterodímeros con Max para poder unirse al ADN (6,7) e inducir la proliferación celular, la transformación tumoral y la activación de la transcripción de los genes diana de MYCN (8). Los niveles elevados de proteína mycN no son suficientes para provocar cambios, pero sí son necesarios.

Si un aumento en el número de copias del gen implica pronóstico desfavorable, ¿la cantidad de proteína presente en las células tumorales podría ser un factor pronóstico? El objetivo de este estudio es comparar el estado del gen MYCN, analizado mediante FISH, con la proteína mycN, detectada mediante estudio inmunohistoquímico, en 220 muestras de neuroblastoma para establecer el posible valor pronóstico de los niveles de proteína.

Este estudio inmunohistoquímico incluye el anticuerpo Ki-67: un marcador nuclear de proliferación celular, que se relaciona con el grado de diferenciación del tumor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 220 de las más de 500 muestras de tumores neuroblásticos recogidas por el Centro Español de

Referencia para estudios biológicos y anatomopatológicos de Neuroblastoma de la SEOP (Sociedad Española de Oncología Pediátrica), desde enero de 1999 hasta diciembre de 2005. Han sido analizadas histopatológicamente siguiendo los criterios de INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification) para diagnosticarlos mediante tinción con hematoxilina-eosina y anticuerpos específicos, como NB84, en secciones de parafina. La clasificación final de las muestras es la siguiente: 33 NB indiferenciados (NB i), 117 NB pobremente diferenciados (NB pd), 15 NB en diferenciación (NB ed), 26 «Not Otherwise Specified» (NOS), 18 ganglioneuroblastomas (GNB), 7 ganglioneuromas (GN), 3 metástasis y 1 NB in situ.

La mayoría de las muestras presentaban porcentajes de células tumorales por encima del 50%.

El estado del gen MYCN se ha analizado mediante FISH con la sonda 2p24 (MYCN) red/  $\alpha$ -sat. 2 (D2Z) green de QBIogene (KREATECH Biotechnology BV, Amsterdam, Holanda), estudiando el número de copias presentes en, al menos, 200 núcleos de cada muestra.

El protocolo para las muestras parafinadas (20) comienza con la desparafinación con xilol y la rehidratación con alcoholes decrecientes. Las muestras reciben un pretratamiento con olla a presión con tampón citrato al 1:10 y después son digeridas con proteinasa K a 37°C. Se lavan con tampón 2xSSC y se fijan con formalina tamponada al 10%. Las muestras lavadas y secas son codesnaturalizadas junto con la sonda a 90°C y se dejan hibridando toda la noche a 37°C. El segundo día son lavadas con 0,3% NP-40/tampón 2xSSC a temperatura ambiente y a 73°C. Se realiza la contratinción con DAPI antifade de QBIogene (KREATECH Biotechnology BV, Amsterdam, Holanda).

Las muestras no parafinadas (220) son fijadas con paraformaldehído al 4% a 4°C. Después se lavan con tampón PBS y son digeridas con pepsina a 37°C. Se lavan de nuevo con tampón PBS y son deshidratadas y se dejan secar. Se codesnaturalizan con la sonda a 78°C y se dejan hibridando toda la noche a 37°C. Al día siguiente son lavadas con formamida /2xSSC al 50% y pH=7 a 43°C, fijadas con paraformaldehído al 4% a 4°C y lavadas con PBS. Después de ser deshidratadas y secas, se hace la contratinción con DAPI antifade.

La interpretación del FISH se hizo siguiendo los criterios del ENQUA (European Neuroblastoma Quality Assessment group), siendo AMPLIFICADOS (MNA) aquellos con más de 4 veces el número de señales de MYCN en relación con el número de señales del centrómero del cromosoma 2. El grupo de GANANCIAS (MNG) se define como aquellos casos entre 1 y 4 veces más el número de señales de MYCN en relación con el número del centrómero del cromosoma 2. Las muestras NO AMPLIFICADAS (MNNA) son aquellas con el mismo número de señales de MYCN que del centrómero del cromosoma 2 (fig. 1).

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4138050>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4138050>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)