

ORIGINAL

Detección inmunohistoquímica de la mutación BRAF V600E en el carcinoma papilar de tiroides. Evaluación frente a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real



Miguel Paja Fano^{a,c,*}, Aitziber Ugalde Olano^b, Elena Fuertes Thomas^b
y Amelia Oleaga Alday^a

^a Servicio de Endocrinología, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, España

^c Universidad del País Vasco (UPV-EHU), Bilbao, España

Recibido el 2 de septiembre de 2016; aceptado el 16 de diciembre de 2016

Disponible en Internet el 10 de febrero de 2017

PALABRAS CLAVE

Carcinoma papilar
de tiroides;
Mutación BRAF
V600E;
Inmunohistoquímica;
PCR en tiempo real;
Biología molecular

Resumen

Introducción: La mutación V600E de BRAF (protooncogén B-Raf) asocia mayor riesgo de persistencia y recidiva en el carcinoma papilar de tiroides, y puede modificar la cirugía o el seguimiento. Las tecnologías de biología molecular empleadas en su detección son caras y técnicamente demandantes. Recientemente se ha propuesto la evaluación inmunohistoquímica (IHQ), más sencilla y asequible, que permitiría universalizar su evaluación.

Objetivo: Comparar los resultados y el coste económico del estudio IHQ frente a la PCR en tiempo real (RT-PCR) para la detección de BRAF V600E en los carcinomas papilares de tiroides. Se incluyó el análisis de las diferencias clínico-patológicas según el resultado por RT-PCR.

Métodos: Estudio prospectivo sobre 82 muestras consecutivas, 54 de ellas biopsias con aguja gruesa. El estudio IHQ se realizó con el anticuerpo monoclonal murino VE-1, y fue categorizado como positivo o negativo. La detección mediante RT-PCR se realizó con la prueba diagnóstica Cobas® 4800 (Roche) sobre ADN extraído del tejido fijado por microdissección manual.

Resultados: Ambas técnicas fueron concordantes en 81 casos (98,8%), con un resultado discordante, positivo en la IHQ y negativo en la RT-PCR, atribuido a heterogeneidad histológica. Solo en gasto de material diagnóstico, la IHQ logra un ahorro superior al 50% frente a la técnica molecular.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: miguel.pajafano@osakidetza.net (M. Paja Fano).

KEYWORDS

Papillary thyroid carcinoma;
 BRAF V600E mutation;
 Immunohistochemistry;
 Real time PCR;
 Molecular biology

Conclusiones: La detección IHQ de la mutación BRAF V600E presenta una elevada fiabilidad, sin falsos negativos, en muestras adecuadamente procesadas. Su empleo permite abaratar costes y generalizar su empleo, especialmente en centros sin acceso rutinario a técnicas de biología molecular.

© 2017 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. Evaluation against real-time polymerase chain reaction

Abstract

Introduction: The BRAF V600E mutation is the most common genetic change in papillary thyroid carcinoma and is associated with a poorer clinical course. Usual methods for its study (DNA sequencing or molecular test based on PCR) are expensive and time-consuming. Recently, immunohistochemistry (IHC) for BRAF mutation has been introduced.

Objective: To compare the results of IHC and real time PCR (RT-PCR) in the detection of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. Analysis of clinical and pathological differences depending on RT-PCR results is included.

Methods: A prospective study was performed in 82 consecutive samples, 54 of them taken through a core needle biopsy. IHC was performed on tissue fixed for 24 hours with 10% neutral formalin using the anti-BRAF V600E (VE-1) mouse monoclonal primary antibody and was rated as positive or negative. DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by manual microdissection, and BRAF mutation was detected by RT-PCR using the Cobas® 4800 BRAF V600 mutation test (Roche).

Results: Both techniques were concordant in 81 cases, and BRAF was positive in 49. Discordance appeared in a follicular variant showing positive IHC and negative RT-PCR, attributed to histological heterogeneity. Cost of materials for IHC was less than half of the cost for RT-PCR.

Conclusions: IHC appears to be a reliable, economical and easily available alternative to molecular biology techniques for routine detection of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma patients, provided optimal fixation conditions are used. It may be a useful technique in hospitals with no access to molecular biology techniques.

© 2017 SEEN. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La mutación V600E de BRAF (protooncogén B-Raf) es la alteración genética presente con mayor frecuencia en el carcinoma papilar de tiroides (CPT), alcanzando una prevalencia del 29 al 83% según las diferentes poblaciones¹. Numerosos estudios han demostrado su asociación con características clínico-patológicas agresivas², así como con una mayor recurrencia de la enfermedad³. Debido a esta asociación, su presencia ha sido considerada como un potencial marcador pronóstico en el CPT, y se ha incluido como un indicador de riesgo adicional en determinados subtipos de neoplasias en las recientes guías de la *American Thyroid Association*⁴. Su detección preoperatoria también ha sido empleada para establecer el diagnóstico de carcinoma papilar en muestras citológicas indeterminadas⁵.

Para identificar la mutación se han desarrollado varios métodos moleculares. Los dos más empleados son los que siguen. El primero consiste en la secuenciación directa del ADN amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por el método Sanger, que aprovecha el análisis de los diferentes fragmentos de ADN complementario generados por la incorporación de dideoxinucleótidos que detienen

la replicación de la cadena. Una variante comúnmente empleada es la pirosecuenciación, basada en la detección de la liberación del pirofosfato tras la incorporación de nucleótidos.

El segundo de los métodos es el que se basa en la PCR específica de alelos. La más utilizada para la identificación de biomarcadores moleculares en tumores es la PCR en tiempo real (RT-PCR)^{6,7}. Esta técnica destaca por su alta sensibilidad, (detecta la mutación con menos de un 10% de células tumorales en la muestra), reproducibilidad y capacidad de automatización. Existen 2 tipos de sondas para la determinación de mutaciones en BRAF, denominadas TaqMan® y Scorpions®. La prueba diagnóstica cobas®4800 (Roche), diseñada para determinar la mutación V600E, utiliza la sonda TaqMan® y está aprobada por la Food and Drug Administration como prueba diagnóstica in vitro. La sonda Scorpions® se utiliza con la prueba BRAF gen rotor Q de Qiagen®. La RT-PCR tiene un elevado coste económico y, al desarrollarse en varios pasos sucesivos, requiere mucho trabajo y un elevado consumo de tiempo. Por esta razón, su disponibilidad es limitada.

Recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo específico para la mutación que permite la visualización

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/8922738>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/8922738>

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