

# Determinación de la mutación BRAF V600E en melanomas de pacientes uruguayos

Dres. María Eugenia Mazzei\*, Jimena Hochmann†, Gonzalo Manrique‡, Ana Luisa Mariño§, Lucía Delgado¶, Miguel Martínez Asuaga\*\*

Cátedras de Dermatología, Oncología Clínica y Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

## Resumen

**Introducción:** la identificación de cambios genéticos que están en la base de la génesis del melanoma ha permitido el desarrollo de terapias dirigidas específicamente contra ellos, lo que determinó, por primera vez en la historia del tratamiento sistémico del melanoma, un incremento en la supervivencia de los pacientes con enfermedad avanzada. Los mejores resultados se han obtenido con vemurafenib, terapia dirigida contra BRAF y que solo es efectiva cuando existe la mutación V600E, por lo que su frecuencia en una población determinada mide el impacto que podría tener en términos de salud.

**Objetivo:** evaluar la frecuencia de la mutación V600E en BRAF en melanomas provenientes de pacientes uruguayos.

**Material y método:** se tomaron 28 muestras de melanoma microdisecadas y se les realizó la investigación de la mutación V600E mediante ASO-PCR (allele specific oligonucleotide - polymerase chain reaction).

**Resultados:** se logró amplificar el ácido desoxirribonucleico

(ADN) en 27 de las 28 muestras y se detectó la mutación en 21 de ellas (FR: 0,78).

**Discusión:** trabajos previos muestran una frecuencia menor de melanomas portadores de la mutación V600E de BRAF (40%-60% en población caucásica y 25% en población asiática) a la observada en nuestro estudio. Nuestros resultados, si bien requieren confirmación mediante la inclusión de un mayor número de pacientes, podrían explicarse, al menos en parte, por diferencias en la técnica utilizada y tal vez por una proporción diferente de pacientes con melanomas asociados con exposición solar intermitente.

**Palabras clave:** PROTEÍNAS PROTO-ONCOGÉNICAS B-RAF  
MUTACIÓN  
MELANOMA

**Keywords:** PROTO-ONCOGENE PROTEINS B-RAF  
MUTATION  
MELANOMA

\* Profesora Adjunta Cátedra de Dermatología. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

† Cátedra de Genética. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

‡ Cátedra de Medicina Nuclear. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

§ Profesora Agregada de Cátedra de Anatomía Patológica. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

¶ Profesora Cátedra de Oncología Clínica. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

\*\* Profesor Cátedra de Dermatología. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

Autor responsable: Dra. María Eugenia Mazzei. Correo 588/36, Pando. Uruguay, CP 91000. Correo electrónico: memazzei@hc.edu.uy

Conflicto de intereses: este trabajo fue subvencionado por la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer.

Recibido: 9/12/12

Aceptado: 30/3/13

## Introducción

El melanoma maligno (MM) es la forma de cáncer con mayor crecimiento en su tasa de incidencia, lo que se vincula al incremento de la exposición recreacional a la radiación ultravioleta (RUV) en forma intensa e intermitente. En nuestro país se diagnostican aproximadamente 180 casos por año<sup>(1)</sup>. El pronóstico al momento del diagnóstico depende fundamentalmente de la extensión lesional. Así, mientras que en los pacientes que se presentan con enfermedad localizada y espesor de Breslow menor a 1 mm el pronóstico es excelente, en las formas avanzadas, en general, es un cáncer devastador para el cual solo recientemente se han logrado avances terapéuticos significativos en lo que hace a la sobrevida global.

En efecto, la dacarbazina, tratamiento sistémico considerado estándar hasta 2011, permite obtener tasas de respuesta muy modestas (5% a 10%) de corta duración y sin impacto en la sobrevida<sup>(2,3)</sup>. En junio de 2011, Chapman y colaboradores publicaron un ensayo en fase III en el cual evaluaron la sobrevida global de pacientes tratados con un nuevo agente biológico, vemurafenib, que interactúa con BRAF cuando existe una mutación específica, la V600E (glutamato en lugar de valina en el codón 600)<sup>(4)</sup>. En dicho estudio se comparó vemurafenib con dacarbazina en 675 pacientes sin tratamiento previo, portadores de melanoma metastásico con la mutación V600E de BRAF. Vemurafenib se asoció a una disminución relativa del riesgo de morir cercana a 64% y una tasa de respuesta de 48% frente a 5% de dacarbazina. En el mismo trabajo se establece que este fármaco no mostró beneficio en pacientes sin esta mutación, por lo que la determinación de la misma es un requisito obligado previo a su indicación<sup>(4,6)</sup>.

BRAF es una serina/treonina kinasa que activa la vía de transducción de la kinasa MAP/ERK. Entre las mutaciones activadoras de BRAF, la más frecuente es la V600E, resultado de la transversión timina a adenina en el nucleótido 1799 (T1799A). Esta mutación ha sido reportada en 40% a 60% de los melanomas que ocurren en población caucásica, siendo más frecuente en los inducidos por radiación solar que aparecen en piel previamente sana que en aquellos que aparecen en piel con daño solar crónico, en mucosas y en zonas acrales<sup>(7-9)</sup>. En la población asiática esta mutación ha sido observada en el 25% de los pacientes estudiados<sup>(10)</sup>. No hemos encontrado reportes sobre la frecuencia de mutación V600E de BRAF en poblaciones mediterráneas y latinoamericanas.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la frecuencia de la mutación V600E en BRAF en melanomas provenientes de pacientes uruguayos, lo cual podría ser de enorme importancia a la hora de analizar el posible impacto del uso de vemurafenib en nuestro medio.

## Material y método

### Muestras de tejidos

Se estudiaron muestras tumorales obtenidas por microdissección de biopsias de melanoma cutáneo primario invasivo correspondientes a 28 pacientes diagnosticados en la Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas en Montevideo, Uruguay, entre los años 1997 y 2000. En todos los casos se trató de biopsias fijadas con formol al 10%, tamponado en 27 de las 28 muestras.

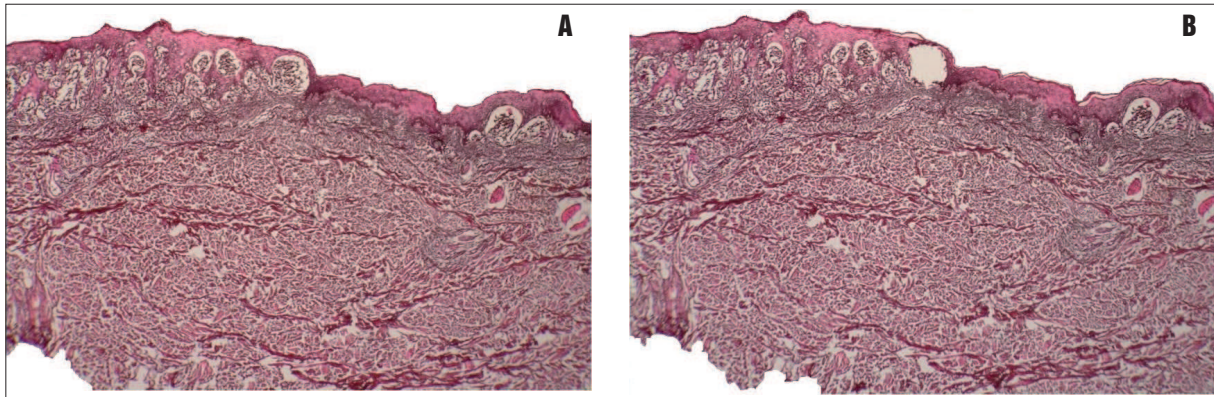
**Microdissección y extracción de ADN:** la microdissección de las muestras de melanoma fue realizada en el Departamento de Patología de la Pontificia Universidad Católica de Chile de acuerdo al método previamente reportado por Going y Lamb<sup>(11)</sup>.

Utilizando un microscopio invertido con micromanipulador para microdissección se seleccionaron los campos de interés en la lámina histológica, se rasparon utilizando una micropipeta de Pasteur modificada con punta ultrafina hasta que las células se desprendieron del tejido (figura 1). Estas se colocaron en tubos de microcentrífuga numerados y se mantuvieron a temperatura ambiente.

La extracción de ADN se llevó a cabo de la siguiente manera: aproximadamente un total de 500 a 1.000 células del tejido microdissecado fueron digeridas en 20 µL de buffer de digestión (proteinasas K 1 mg/ml, 50 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA pH 8, y 0,45% de Tween-20) a 52 °C durante la noche. La proteinasas K fue desnaturalizada a 95 °C por 15 minutos. Las soluciones de ADN fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización<sup>(12)</sup>.

**Detección de la mutación V600E en muestras de melanoma microdissecadas mediante ASO-PCR:** para realizar esta técnica se utilizó el protocolo descrito por Sapio y colaboradores<sup>(12)</sup>, el cual fue modificado incluyendo una segunda vuelta de amplificación para obtener una mayor sensibilidad (hemianidación ASO-PCR). La detección de la mutación V600E fue llevada a cabo en las 28 muestras de melanoma microdissecadas.

Para llevar a cabo la primera ronda de amplificación por PCR se utilizaron 5 µL de ADN genómico obtenidos directamente del buffer de digestión. Se llegó a un volumen final de 25 µL, conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada oligonucleótido y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen TM, Life Technologies, Brasil). En la primera ronda se amplificó un fragmento de 224 pb del exón 15 de BRAF conteniendo el sitio donde se encuentra la mutación T1799A. Para ello se utilizó el siguiente juego de oligonucleótidos.



**Figura 1.** Microdissección de una muestra de melanoma maligno (MM). A) MM sin microdissecar. B) Misma muestra de MM microdissecada, donde se extrajo selectivamente uno de los nidos de melanocitos para su procesamiento por PCR (H y E X40).

#### Oligonucleótidos externos

##### Sapio-F

5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' [12].

Sapio-R 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3' [12].

Se utilizaron 3 µL de producto de la primera ronda de amplificación como molde para realizar dos reacciones por separadas (hemianidación), utilizando uno de los oligonucleótidos externos que previamente se había empleado en la primera ronda de amplificación (Sapio-R) y uno de los dos oligonucleótidos internos (ASO), los cuales difieren únicamente en el extremo 3'; uno amplifica el alelo normal y otro el mutante [11]. Esto generó un producto de PCR de 123 pb.

#### Oligonucleótidos ASO internos

ASO WT: 5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT-3' [12].

ASO M: 5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3' [12].

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo separadamente en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. EE.UU.), según el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos y 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 3% y visualizados por tinción con bromuro de etidio bajo luz UV<sup>(12)</sup>. Se utilizaron diez muestras de ADN obtenidas de sangre periférica de individuos sanos (Departamento de Hemoterapia, Hospital de Clínicas) como controles normales, y dos muestras de archivo parafinadas de pacientes portadores de melanoma con la mutación V600E como controles positivos (cortesía de S. González y P. Uribe, Departamento de Patología de la Pontificia Universidad Católica de Chile).

**Herramientas de bioinformática:** mediante el programa de computación Gen Runner 3.05 se realizó un análisis de complementariedad de los oligonucleótidos con su secuencia blanco con la finalidad de verificar el diseño de los mismos. También se realizó un análisis de los sitios de restricción dentro de la secuencia amplificada por PCR.

El presente trabajo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas (Exp. N° 071140-002240-05).

#### Resultados

Se lograron amplificar eficientemente 27 de las 28 muestras analizadas. La muestra que no pudo ser amplificada era de 1997, año en el cual todavía no se utilizaba formol tamponado para realizar la fijación de las piezas en el Hospital de Clínicas. Esto pudo afectar la calidad del ADN, ya que el formol no tamponado, a pesar de preservar la morfología del tejido vivo, puede alterar la calidad del ADN.

De las 27 muestras analizadas mediante la hemianidación ASO-PCR, 21 presentaron la mutación V600E (tabla 1). Esto se observó mediante la presencia de la banda correspondiente a la amplificación del alelo mutante (123pb) por visualización en un gel de agarosa al 3%. Se detectaron 19 muestras que presentaron la amplificación del alelo normal y el alelo mutante, y dos muestras homocigotas para el alelo mutante (tabla 1), con bandas idénticas a los controles positivos aportados. En suma, se encontró la mutación V600E en 21 de las 27 muestras de melanoma amplificadas (FR: 0,78) mientras que seis muestras de pacientes con melanoma fueron homocigotas para el alelo salvaje.

No se puede afirmar con certeza que todos los individuos que amplificaron ambos alelos sean heterocigotos para la mutación, ya que si bien con la técnica de micro-

**Tabla 1.** Genotipo de las 28 muestras de melanoma determinadas por ASO-PCR

1	Amplificó alelo mutante y salvaje
2	Homocigota para alelo salvaje
3	No amplificó
4	Amplificó alelo mutante y salvaje
5	Amplificó alelo mutante y salvaje
6	Homocigota para alelo salvaje
7	Homocigota para alelo salvaje
8	Amplificó alelo mutante y salvaje
9	Amplificó alelo mutante y salvaje
10	Amplificó alelo mutante y salvaje
11	Homocigota para alelo salvaje
12	Amplificó alelo mutante y salvaje
13	Amplificó alelo mutante y salvaje
14	Amplificó alelo mutante y salvaje
15	Amplificó alelo mutante y salvaje
16	Amplificó alelo mutante y salvaje
17	Homocigota para alelo salvaje
18	Homocigota para alelo salvaje
19	Amplificó alelo mutante y salvaje
20	Amplificó alelo mutante y salvaje
21	Amplificó alelo mutante y salvaje
22	Amplificó alelo mutante y salvaje
23	Amplificó alelo mutante y salvaje
24	Homocigota para alelo salvaje
25	Amplificó alelo mutante y salvaje
26	Homocigota para alelo salvaje
27	Amplificó alelo mutante y salvaje
28	Amplificó alelo mutante y salvaje

dissección de tejidos se minimiza la presencia de células no tumorales, la mezcla celular (células normales y células tumorales) puede estar presente.

La mutación V600E fue detectada en ambos controles positivos y no se detectó en las diez muestras de ADN de sangre periférica de individuos sanos, en las que únicamente se amplificó el alelo salvaje por lo que

no hubo amplificación inespecífica (falsos positivos), mostrando una adecuada relación especificidad/sensibilidad.

### Discusión

Nuestros resultados, si bien fueron obtenidos a partir de una muestra pequeña, evidenciaron una frecuencia de la mutación V600E de BRAF (FR: 0,78), más elevada que la observada en estudios previos.

En efecto, la frecuencia de la mutación V600E de BRAF reportada previamente en pacientes caucásicos portadores de melanoma es de 40% a 60%<sup>(7,8,13)</sup>. Por otra parte, trabajos recientes en poblaciones asiáticas muestran una frecuencia mucho menor que apenas supera el 25%<sup>(13)</sup>. Estos datos sugieren diferencias poblacionales en esta mutación, lo que tendría un indudable impacto en el beneficio esperable de los tratamientos con los nuevos inhibidores específicos de BRAF, tales como vemurafenib, dabrafenib y trametinib, los cuales requieren la mutación V600E/K para actuar, beneficio que podría ser variable según la región geográfica y la etnia consideradas. En relación con la composición genética de nuestra población, estudios recientes muestran una contribución europea predominante (84%), fundamentalmente española, a la que se agrega la amerindia (10%) y la africana (6%)<sup>(14)</sup>.

En nuestro estudio la mayoría de los melanomas se desarrollaron en áreas de la piel con exposición solar intermitente, es decir que correspondieron al tipo de melanomas en los que la mutación V600E es más frecuente. Sin embargo, esto no explicaría totalmente la elevada frecuencia de esta mutación observada en el presente estudio, ya que en reportes previos en los que esta variable fue considerada, la frecuencia observada en este tipo de melanomas no superó el 60%<sup>(8)</sup>.

La mayor frecuencia observada en nuestra serie podría ser explicada, al menos en parte, por la sensibilidad del método utilizado. En efecto, la microdissección de las células tumorales permite determinar la mutación en las células de melanoma exclusivamente, sin interferencia del ADN de queratinocitos o células dérmicas, lo que determinaría una mayor capacidad de detección del método.

Por otra parte, la técnica de detección de la mutación V600E utilizada en nuestro estudio difiere de la empleada en los trabajos previos en los cuales se utilizó la secuenciación directa o el método COBAS<sup>®</sup><sup>(15)</sup>, por lo que no es posible realizar una comparación confiable.

En nuestro conocimiento no existen reportes previos de la frecuencia de mutaciones V600E de BRAF en pacientes latinoamericanos con melanoma cutáneo.

Nuevos trabajos con mayor número de muestras estudiadas y que comparen las técnicas y eventualmente

las integren (microdissección y luego secuenciación) permitirán obtener cifras confiables que a su vez nos permitan evaluar el impacto esperable en nuestra región de las nuevas terapias dirigidas contra BRAF para el tratamiento del melanoma avanzado.

## Abstract

**Introduction:** identifying genetic changes that occur in melanoma genesis has enabled the development of therapies that are specifically geared against such changes, what resulted in an increase of patients' survival for the first time in the history of systemic treatment of melanoma, in patients with advanced disease. The best results have been obtained with vemurafenib, a therapy that targets the BRAF protein and is only effective in the presence of the V600E mutation. Thus, its frequency in a certain population measures its potential impact in health figures.

**Objective:** to evaluate the frequency of the V600E mutation in BRAF in melanomas of Uruguayan patients.

**Method:** 28 samples of microdissected melanoma were studied and V600E mutation was tested through ASO-PCR (allele specific oligonucleotide - polymerase chain reaction).

**Results:** we managed to amplify DNA in 27 out of the 28 samples and the mutation was identified in 21 of them (FR: 0.78).

**Discussion:** previous works demonstrated a lower presence of melanomas that are carriers of the V600E mutation of BRAF (40%-60% in the Caucasian population and 25% in the Asian population) than what our study revealed. Our results, in spite of the need to include a larger number of patients, could partially be due to differences in the technique used and maybe as a consequence of a different proportion of patients with melanomas associated to the intermittent sun exposure.

## Resumo

**Introdução:** a identificação de alterações genéticas associadas a origem do melanoma permitiram desenvolver terapias orientadas especificamente contra elas, o que possibilitou, pela primeira vez na história do tratamento sistêmico do melanoma, um aumento da sobrevivência dos pacientes com doença avançada. Os melhores resultados foram obtidos com vemurafenib, terapia dirigida contra BRAF e que somente é efetiva quando existe a mutação V600E; sua frequência em uma população determinada mede o impacto que poderia ter sobre a saúde dessa população.

**Objetivo:** avaliar a frequência da mutação V600E em BRAF em melanomas provenientes de pacientes uruguaios.

**Material e método:** foram obtidas 28 amostras microdissecadas de melanoma nas quais fez-se uma pesquisa da mutação V600E utilizando ASO-PCR (allele specific oligonucleotide - polymerase chain reaction).

**Resultados:** foi possível amplificar o ácido desoxirribonucleico (ADN) em 27 das 28 amostras; a mutação foi detectada em 21 (FR: 0,78).

**Discussão:** trabalhos anteriores mostram uma frequência menor de melanomas portadores da mutação V600E de BRAF (40%-60% na população caucasica e 25% na população asiática) à observada no nosso estudo. Nossos resultados, embora seja necessário realizar um estudo com um maior número de pacientes, poderiam ser explicados, pelo menos parcialmente, pelas diferenças na técnica utilizada e talvez por uma proporção diferente de pacientes com melanomas associados com exposição solar intermitente.

## Bibliografia

1. **Barrios E, Vassallo J, Alonso R, Garay M, Musetti C.** III Atlas de incidencia del cáncer en Uruguay 2002-2006. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2010.
2. **Ko JM, Fisher DE.** A new era: melanoma genetics and therapeutics. *J Pathol* 2011; 223(2):241-50.
3. **Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F.** Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19(1):21-34.
4. **Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al.** Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364(26):2507-16.
5. **Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N.** RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010; 464(7287): 427-30.
6. **Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, et al.** Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010; 8:67-9.
7. **Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892):949-54.
8. **Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al.** Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353(20):2135-47.
9. **Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al.** Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:127-55.
10. **Si L, Kong Y, Xu X, Flaherty KT, Sheng X, Cui C, et al.** Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer* 2012; 48(1):94-100.
11. **Going JJ, Lamb RF.** Practical histological microdissection for PCR analysis. *J Pathol* 1996; 179(1):121-4.

12. **Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, et al.** Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol* 2006; 154(2):341-8.
13. **Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al.** The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* 2012; 10:85.
14. **Sans M, Salzano FM, Chakraborty R.** Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* 1997; 69(2):161-70.
15. **Cheng S, Koch WH, Wu L.** Co-development of a companion diagnostic for targeted cancer therapy. *N Biotechnol* 2012; 29(6):682-8.