

# Estudio de la expresión de BRAF por inmunohistoquímica en carcinomas hepatocelulares

## Immunohistochemical study of BRAF expression in hepatocellular carcinoma

Daniela Speisky, Valeria Grossoni, Alejandro Iotti, María Teresa García de Dávila

### RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un tumor agresivo con opciones terapéuticas limitadas. En este contexto, BRAF aparece como un blanco molecular interesante en relación a un inhibidor de la RAF quinasa (sorafenib), indicado actualmente en pacientes con CHC avanzados. La alteración de BRAF en CHC mostró una amplia variación según las distintas series, sugiriendo estudios más amplios para esclarecer dichos interrogantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el anticuerpo BRAF por inmunohistoquímica y el análisis de su expresión en CHC. Si bien la totalidad de los CHC (n=57) estudiados en este trabajo resultaron negativos para dicho marcador, se pudo estandarizar la técnica con controles adecuados, lo que permitirá estudios futuros de la alteración de BRAF en este y otros tipos de tumores.

**Palabras clave:** carcinoma hepatocelular; BRAF, terapia molecular; inmunohistoquímica.

### ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is an aggressive tumour with limited therapeutic options. For this reason, BRAF became an interesting molecular target related to the development of a RAF kinase inhibitor, Sorafenib, currently indicated in patients with advanced HCC. Alteration of BRAF in HCC deserves special attention due to its broad variation in different series, suggesting more studies to elucidate this molecular pathway in hepatocytic carcinogenesis. The aim of this study was to analyse BRAF antibody by immunohistochemistry and the expression in HCC. Even though all the HCC studied (n=57) were negative for BRAF, in this study we could standardize the technique with appropriate controls, allowing further studies of BRAF alteration in HCC and other tumours.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma, BRAF, molecular therapy, immunohistochemistry.

Fronteras en Medicina 2017;12(3):92-96

### INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular (CHC) representa el tumor hepático primario más frecuente y se caracteriza por su agresividad y pronóstico desfavorable<sup>1,2</sup>. Hasta la fecha las opciones terapéuticas son limitadas y dependen en gran medida del estadio de la enfermedad, no existiendo ningún tratamiento quimioterapéutico completamente efectivo en los casos avanzados<sup>3</sup>. Por dichas razones, el desarrollo de terapias moleculares aparece como un camino prometedor, en donde se intenta bloquear molé-

culas específicas relacionadas a la carcinogénesis, con la ventaja de ser más efectivas contra las células neoplásicas y menos deletéreas para las células no tumorales<sup>4,5</sup>. A tal efecto, diferentes vías moleculares y su relación con la hepatocarcinogénesis están siendo estudiadas. Sin embargo, los resultados obtenidos siguen siendo discordantes y contradictorios<sup>3</sup>. Un ejemplo lo constituye la vía de la MAPK (proteín quinasa activadas por mitógenos), que incluye la cascada de RAS-BRAF-MEK, ligada al control del crecimiento celular, la proliferación y la migración celular<sup>3,5</sup>. La implicancia de los distintos componentes de dicha vía, ha sido descripta en diferentes tipos de tumores. Sin embargo, la alteración de *BRAF* en los CHC, demostró una amplia variación según las distintas series (0 a 23%)<sup>3,6</sup>. A pesar de estos resultados, *BRAF* sigue siendo considerado como un blanco molecular interesante, en relación con un inhibidor de la RAF quinasa (sorafenib), indicado actualmente en pacientes con CHC avanzados<sup>3,6-9</sup>.

Estos hallazgos, sumados a la escasa frecuencia de reportes de este tipo tumoral en nuestro país, despertaron nuestro interés en el estudio de los CHC<sup>10,11</sup>.

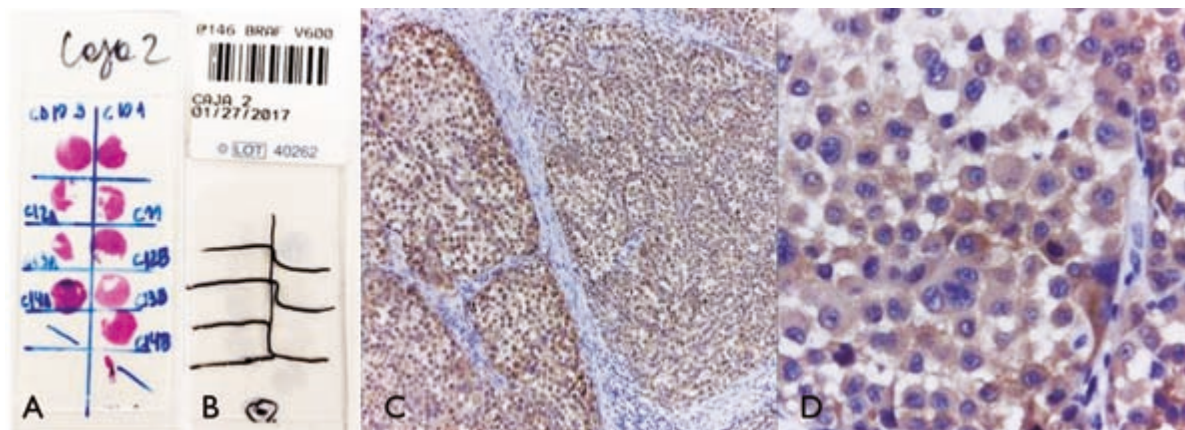
El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el anticuerpo *BRAF* por inmunohistoquímica y el análisis de

Servicio de Histopatología.  
Hospital Británico de Buenos Aires.

Correspondencia: Dra. Daniela Speisky | Servicio de Histopatología, Hospital Británico. Perdriel 74, C1280AEB CABA, Rep. Argentina | TE: +5411 4309 – 6400 (int): 2406. C1280AEB CABA, Rep. Argentina | danispeisky@hotmail.com

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 12/05/2017 | Aceptado: 07/07/2017



**Figura 1.** Preparados histológicos correspondientes al TMA de CHC coloreados con hematoxilina y eosina (A) y técnica de inmunohistoquímica con BRAF (B). C y D, testigo positivo para BRAF, correspondiente a metástasis subcutánea de melanoma con patrón de expresión citoplasmático y difuso. Aumento original: 100X (C); 400X (D). Ref: TMA: tissue microarray, CHC: Carcinoma hepatocelular.

su expresión en CHC provenientes de piezas quirúrgicas de pacientes con diversas hepatopatías de base.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 51 piezas quirúrgicas con CHC correspondientes a pacientes operados en el Hospital Británico de Buenos Aires entre el 2010 y el 2014. Se describieron las características macroscópicas, histológicas e inmunohistoquímicas de los tumores y se corroboró la hepatopatía de base (virus de hepatitis C o B, intoxicación crónica por alcohol, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, hemocromatosis, de causa indeterminada/criptogénica y etiologías asociadas).

Se seleccionaron los tumores aptos para la construcción de un *tissue microarray* (TMA) que fue utilizado en el presente estudio (Figuras 1A y B).

### Selección de muestras para la construcción del TMA

A partir del análisis histológico con hematoxilina y eosina, 36 casos fueron seleccionados para la construcción de un TMA en tacos de parafina. Se muestrearon entre 1 y 3 áreas tumorales por caso. En total, cincuenta y siete áreas de CHC fueron incluidas. Se excluyeron los casos con extensa necrosis tumoral, fenómenos de hipoxia y autólisis, debido a la escasa celularidad neoplásica evaluable.

### Estudio inmunohistoquímico de BRAF en los CHC incluidos en el TMA

La inmunomarcación se realizó sobre secciones histológicas de 3 micras provenientes de los tacos de parafina del TMA.

Se utilizó el anticuerpo anti *BRAF V600E* (VE1; Ventana; monoclonal de ratón) cuyo blanco es *BRAF*, molécula relacionada al control del crecimiento, la proliferación y la migración celular.

Se seleccionó un testigo adecuado positivo para *BRAF*, correspondiente a metástasis subcutánea de melano-

ma incluida en un taco de parafina, que demostró fuerte positividad para dicho marcador (Figuras 1C y D). El patrón de expresión de *BRAF* (citoplasmático) fue considerado como positivo. Posteriormente, se realizó dicha técnica en los 8 tacos de parafina que incluían al TMA de los CHC bajo las condiciones estándar previamente descriptas.

Las técnicas inmunohistoquímicas se llevaron a cabo mediante un sistema automatizado de inmunomarcación de acuerdo con las pautas del fabricante (Benchmark XT, Ventana). Los cortes histológicos fueron deparafinados y rehidratados. La recuperación antigénica se llevó a cabo mediante pretratamiento con altas temperaturas (60 minutos a 65°C). Para la detección y visualización se utilizó el *kit ultraview* universal DAB (ventana).

## RESULTADOS

En un primer estudio, la totalidad de los tumores así como el testigo previamente testeado resultaron negativos.

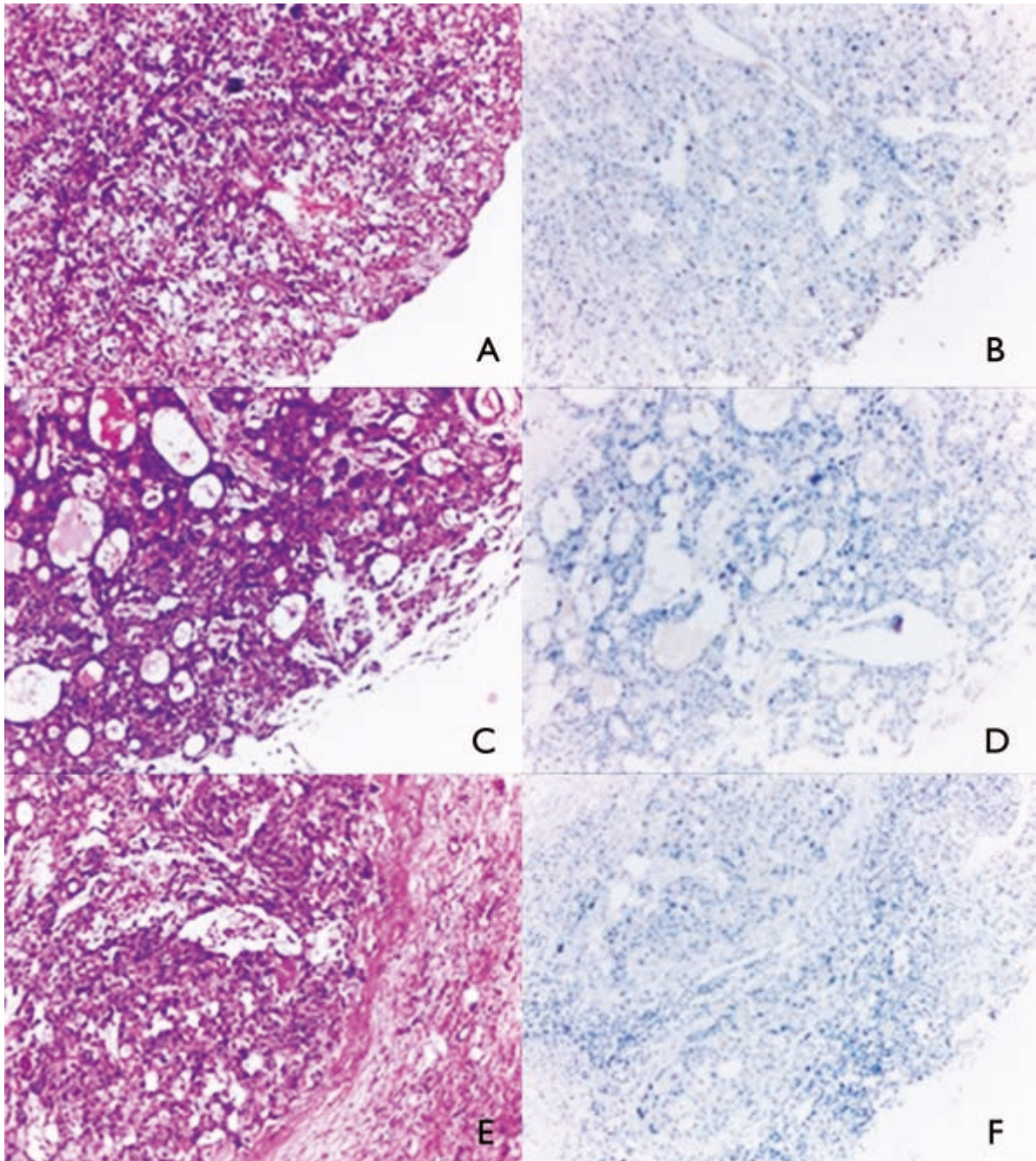
Por este motivo, se decidió retestear el testigo repitiendo dicho procedimiento con 2 cortes histológicos del mismo tejido en condiciones diferentes: uno efectuado una semana previa a la realización de la inmunomarcación, y el otro realizado 24 horas antes de la misma.

Se observó que el testigo en el corte más antiguo fue negativo para *BRAF*, mientras que en el realizado 24 hs antes, la marcación fue positiva fuerte y difusa.

Se repitió el procedimiento de corte de tacos de parafina de TMA conjuntamente con el testigo y la inmunomarcación bajo las nuevas condiciones: corte de los tacos con inmunomarcación en un tiempo no superior a las 48 hs.

Se analizaron los cortes histológicos correspondientes a la inmunomarcación para *BRAF* realizada en los 8 TMA. Los mismos fueron observados por 2 patólogos en forma independiente (MTD y DS). Se dividieron los *spot* de cada corte histológico en grillas.





**Figura 2.** CHC coloreados con hematoxilina y eosina (columna izquierda) y técnica de inmunohistoquímica con BRAF (columna derecha) sobre TMA. A, CHC con arquitectura trabecular, C, CHC con arquitectura pseudoacinar y E, CHC rodeado por una cápsula fibrosa (lado derecho). B, D y F, inmunohistoquímica negativa para BRAF realizada sobre las mismas áreas tumorales. Aumento original: 100X (A a F). Ref: TMA: tissue microarray, CHC: Carcinoma hepatocelular.

Se observó positividad citoplasmática fuerte y difusa en el testigo, con lo cual se validó el estudio.

La totalidad (n=57) de las muestras de CHC fueron negativas para dicho marcador, con una concordancia interobservador del 100% (**Figura 2**).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró estandarizar la técnica inmunohistoquímica para la detección de *BRAF V600E*, utilizando el anticuerpo VE1 (Ventana; mo-

noclonal de ratón), molécula relacionada con el control del crecimiento, la proliferación y la migración celular, y se evaluó su expresión en CHC. Dicho anticuerpo detecta la mutación más frecuente de dicho gen (aproximadamente el 90%) en donde se sustituye una valina por un ácido glutámico en la posición 600 (V600E)<sup>3</sup>. Para dicho estudio se construyó un TMA en tacos de parafina, el cual nos permitió el análisis de una gran cantidad de tumores en menor tiempo y a un menor costo. Una ventaja adicional de la técnica de TMA es que permite el estudio estandarizado de los tumores, al

realizar la inmunomarcación y sus respectivos controles en forma simultánea y bajo las mismas condiciones. Asimismo, el material incluido en tacos de parafina facilita la conservación adecuada del tejido, posibilitando la evaluación futura de nuevos marcadores, asegurando que las áreas tumorales analizadas sean las mismas que las del estudio precedente y de esta manera realizar estudios comparativos.

Por otra parte, destacamos la sencillez técnica del método de inmunohistoquímica en comparación al molecular. Ha sido documentado en la literatura que el estudio inmunohistoquímico de ciertas proteínas es una estrategia equivalente en términos de costo-eficacia al análisis del ADN y además presenta mayor accesibilidad<sup>12,13</sup>. Un ejemplo de interés lo constituye el estudio de *BRAF*, que cobró gran importancia a partir del año 2002, cuando se descubrió su mutación en una amplia variedad de tumores, principalmente en el melanoma. El desarrollo de moléculas inhibitoras de *BRAF* (vemurafenib y dabrafenib) como posible tratamiento para esta neoplasia le dio un *status* esencial a dicha vía molecular<sup>13</sup>. De esta manera se intentó correlacionar los estudios moleculares con los de inmunohistoquímica, con el fin de validar este último método, menos costoso y técnicamente más sencillo al no requerir la extracción del ADN<sup>13</sup>.

La mutación de *BRAF* se encuentra en el 40 al 60% de los melanomas primarios y en la mitad de los metastásicos. El 80 al 90% de los mismos presentan la mutación V600E, el 10 al 15% V600K y el resto otras mutaciones más raras<sup>13</sup>. El estudio inmunohistoquímico para *BRAF* en melanomas reportó altas sensibilidad (85-100%) y especificidad (93-100%), por lo que se validó el método en este tipo tumoral, sugiriendo realizar estudios moleculares solamente en casos de inmunohistoquímica negativa<sup>13</sup>.

La mutación V600E también se encontró en el 45% de los carcinomas papilares y anaplásicos de tiroides, siendo negativo en las variedades folicular y medular. Este método, posee una sensibilidad inmunohistoquímica del 89 al 100% y una especificidad del 61.5 al 100%<sup>13</sup>.

También se observó la mutación de *BRAF* (mayormente V600E) en el 10 al 15% de los adenocarcinomas colorrectales, con una sensibilidad inmunohistoquímica del 71 al 100% y especificidad 68 al 100%. Dicha mutación aparece en forma temprana en los pólipos serrados, mayormente en el colon derecho<sup>13</sup>.

En el presente proyecto, el tumor de interés fue el CHC, por su elevada mortalidad y escasa respuesta a los tratamientos actuales. El estudio de *BRAF* y su probable implicancia en la hepatocarcinogénesis no son claros y los resultados encontrados en este tipo de tumores son variables (0 a 23%)<sup>3,6</sup>. Este hecho es de gran importancia debido al desarrollo del inhibidor de la RAF kinasa (sorafenib), que ha demos-

trado mejorar la esperanza de vida en pacientes con cáncer de hígado avanzado<sup>3,6</sup>.

En nuestra casuística, al igual que en la serie Tannapfel et al., la totalidad de CHC analizados fueron negativos para *BRAF*. Por el contrario, en un estudio de secuenciación de 65 CHC por se observó que el 23% presentaba la mutación *BRAF*<sup>6</sup>. Dicha mutación se asociaba además a factores de mal pronóstico como la presencia de múltiples nódulos y de un mayor índice de proliferación<sup>3</sup>.

Se ha hipotetizado que el *status* poco claro de la prevalencia de la mutación de *BRAF* en CHC podría deberse a la variabilidad geográfica de los pacientes, con diversa predisposición genética y amplia variedad de factores etiológicos asociados<sup>3</sup>. Este hecho, bien conocido en el CHC, contribuye al gran polimorfismo de estos tumores, convirtiéndolos en neoplasias altamente interesantes para su investigación.

Cabe remarcar que en el presente trabajo se utilizó la inmunohistoquímica como método de elección, mientras que en los otros trabajos en CHC se emplearon técnicas de biología molecular únicamente, no existiendo según nuestro conocimiento, estudios comparativos de ambos procedimientos en este tipo tumoral. Este hecho, asociado a la prevalencia discordante de mutaciones de *BRAF* en CHC, no permiten hasta el momento validar la técnica de inmunohistoquímica para la evaluación de dicha alteración en estas neoplasias. Con el fin de dilucidar estos interrogantes, estudios con mayor cantidad de muestras serían necesarios.

Para concluir, en el presente trabajo se pudo corroborar las ventajas de la utilización de la técnica de TMA en tacos de parafina en cuanto a: tiempo, costos, estandarización del estudio, facilidad técnica y de interpretación. Se logró una excelente estandarización técnica del anticuerpo VE1 (Ventana; monoclonal de ratón), constatándose la marcación citoplasmática fuerte y difusa en el testigo utilizado, a pesar de que la totalidad de casos de CHC analizados fueron negativos.

La realización de dicha técnica requiere que los cortes histológicos y la inmunohistoquímica se lleven a cabo en un periodo ideal de 48 horas.

Dada la baja frecuencia de mutación de *BRAF* en CHC, estudios con mayor número de muestras serían necesarios, asociados al estudio molecular, para validar esta técnica en este tipo tumoral.

Dicho estudio muestra la importancia de conocer la expresión en el tumor elegido de este blanco tisular y la posibilidad de mejorar la sobrevida de los pacientes con las nuevas terapias moleculares.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Olga Ocampo y Laboratorio Roche por el soporte técnico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-76.
2. Theise ND, Park YN, Curado MP, et al. Hepatocellular carcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. *World Health Organization Classification Tumors. Pathology and genetics of tumors of the digestive system*. Lyon, France: IARC Press; 2010. p:205-16.
3. Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, et al. BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis* 2012;3:e259;doi: 10.1038/cddis.2011.136.
4. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1752-63.
5. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
6. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52:706-12.
7. Yau T, Chan P, Epstein R, et al. Management of advanced hepatocellular carcinoma in the era of targeted therapy. *Liver Int* 2009;29:10-7.
8. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4293-300.
9. Gauthier A, Ho M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology* 2013;43:147-54.
10. Fassio E, Míguez C, Soria S, et al. Etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina: results of a multicenter retrospective study. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2009;39:47-52.
11. Fassio E, Díaz S, Santa C, et al. Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. *Ann Hepatol* 2010;9:63-9.
12. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005;293:1986-94.
13. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol* 2015;32:400-8.