

PAOLO RUGGERO ERRANTE

*Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP,
São Paulo, SP, Brasil.*

Recebido em fevereiro de 2022.

Aprovado em março de 2022.

MUTAÇÕES BRAF E SUAS IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

RESUMO

Introdução: A proteína BRAF pertence a família RAF de quinases da serina/treonina, e a via RAS/RAF/MEK/ERK atua como transdutora de sinal entre o meio extracelular e núcleo. Sinais extracelulares interagem com os seus receptores e ativam membros da família RAS. BRAF ativa MEK/ERK, que ativam fatores de transcrição que levam a proliferação celular. As mutações BRAF podem levar ao surgimento de diferentes tipos de câncer, e em mais de 90% dos casos, a mutação se encontra no códon V600 do BRAF (V600E/V600K). **Método:** A revisão foi realizada por base de dados bibliográficos obtidos através da pesquisa em LILACS, MEDLINE e PubMed. **Resultados:** Um novo sistema de classificação para mutações BRAF baseada em mecanismos bioquímicos e de sinalização separa as mutações em classe I que sinalizam como monômeros ativos independentes de RAS; mutações classe II que funcionam como dímeros ativados independentes de RAS; e mutações classe III que aumentam a sinalização através da MAPK devido ao aumento da ligação do RAS e subsequente ativação do CRAF. **Conclusão:** Estão disponíveis novas terapias que proporcionam benefícios contra as diferentes classes de mutação BRAF.

Palavras-Chave: câncer; cascata de sinalização; mutação braf; v660e; terapia.

BRAF MUTATIONS AND THEIR THERAPEUTIC IMPLICATIONS

ABSTRACT

Introduction: The BRAF protein belongs to RAF family of serine/threonine kinases, and the RAS/RAF/MEK/ERK pathway acts as signal transducer between the extracellular environment and nucleus. Extracellular signals interact with their receptors and activate members of RAS family. BRAF activates MEK/ERK, which activate transcription factors that cause cell proliferation. BRAF mutations can lead to development of different types of cancer, and in more than 90% of cases, the mutation is found in the V600 codon of BRAF (V600E/V600K). **Method:** The review was performed by bibliographic database obtained through the research in LILACS, MEDLINE and PubMed. **Results:** A new system classification of BRAF mutations based on biochemical and signaling mechanisms separates class I mutations that signal as RAS-independent active monomers; class II mutations that function as RAS-independent activated dimers; and class III mutations that increase signaling through MAPK by increased RAS binding and CRAF activation. **Conclusion:** New therapies are available that provide benefits against different classes of BRAF mutations.

Keywords: cancer; signaling cascade; braf mutation; v660e; therapy.

Revista UNILUS Ensino e Pesquisa

Rua Dr. Armando de Salles Oliveira, 150
Boqueirão - Santos - São Paulo
11050-071

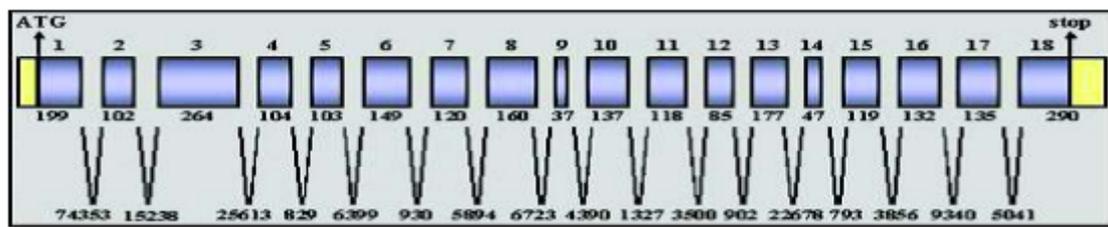
<http://revista.lusiada.br/index.php/ruep>
revista.unilus@lusiada.br

Fone: +55 (13) 3202-4100

INTRODUÇÃO

O gene BRAF, denominado homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v-raf, está localizado no cromossomo 7q34 e codifica a proteína RAF tipo B. O gene BRAF é composto por 17 íntrons e 18 exons e possui 190.284 pares de bases (pb) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do gene BRAF.

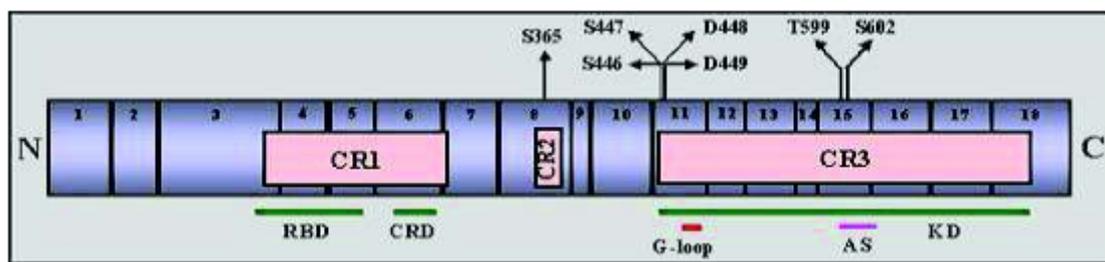


Fonte: Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology.
<http://atlasgeneticsoncology.org/>.

O BRAF é um membro do fibrossarcoma rapidamente acelerado (RAF), família RAF de quinases serina/treonina quinases citosólicas de mamíferos, e atua como enzima que modula a função de outras proteínas pela transferência de grupamentos fosfato, sendo elas próprias ativadas por fosforilação. Ela sinaliza a jusante da proteína RAS através das vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) e pela via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e serina/treonina quinase (AKT ou PBK) (DANKNER et al., 2018).

A proteína BRAF possui 766 aminoácidos e 84.436 daltons de peso molecular e localização citoplasmática. As proteínas RAF possuem uma estrutura comum, consistindo de um domínio regulatório N-terminal e um domínio quinase C-terminal. No domínio regulatório, encontram-se duas regiões homólogas conservadas, onde estão os sítios de ligação a proteína RAS e o domínio rico em cisteína (CR1), além do domínio rico em serina e treonina (CR2). No domínio de quinase encontra-se o segmento de ativação (CR3), requerido para a atividade da proteína RAF (Figura 2) (DAVIES et al., 2002).

Figura 2. Estrutura da proteína BRAF. Em azul estão representados os exons, e em rosa as regiões conservadas da proteína (CR1, CR2, CR3), e as barras verdes correspondem aos domínios RBD (domínio de ligação RAS), CDR (domínio rico em cisteína, e KD (domínio quinase). A barra vermelha indica uma glicina conservada (G-loop) no exon 11, e a barra rosa no exon 15 indica o segmento de ativação (AS). As setas negras indicam os sítios de fosforilação. C=carboxi-terminal; N=amino-terminal.



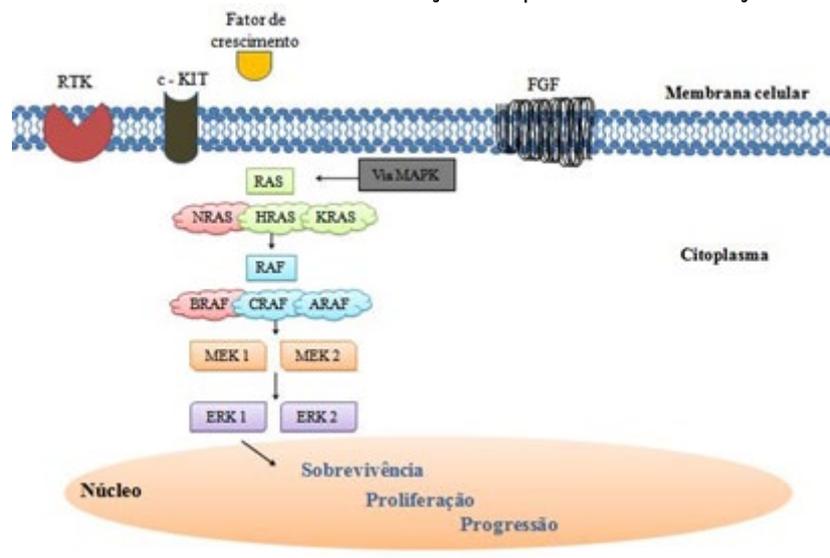
Fonte: Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology.
<http://atlasgeneticsoncology.org/>.

Nos mamíferos existem três isoformas de RAF quinases: A-Raf, presente nos tecidos urogenitais; B-Raf (BRAF), expressa em neurônios, testículos e em menores níveis nas células hematopoiéticas e tireóide, sendo a forma mais predominante nas células foliculares e C-Raf (CRAF), expressa de modo ubíquo (NA et al., 2015).

Via de sinalização MAPK

O BRAF é um dos três membros da família RAF de serina/treonina quinases, cujos produtos proteicos são efetores da via MAPK: RAF-MEK-ERK (Figura 3) (DHOMEN, MARAIS, 2009).

Figura 3. Sinalização MAPK após a ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina-quinase (RTK). A proteína vírus do sarcoma de rato (RAS) ativada recruta RAF que por sua vez torna-se ativada. RAF ativada, fosforila e ativa a quinase ativadora da MAP quinase (MEK), que por sua vez fosforila e ativa a quinase regulada por sinal extracelular (ERK). ERK ativado medeia a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Mutações em BRAF mantêm ativo desencadeando a cascata de sinalização dispensando a ativação via RAS.



Fonte: DHOMEN, MARAIS, 2009.

A proteína RAF é recrutada do citoplasma, sendo ativada em múltiplos passos que envolvem a defosforilação de sítios inibitórios (mantêm a proteína no estado inativo) pela fosfatase 2A (PP2A), e a fosforilação de sítios ativadores pela quinase 2 ativada por p21, beta-PAK (PAK3) e quinases da família da proteína oncogênica PP60(V-SRC) do vírus do sarcoma de Rous (Src). A proteína RAF ativada fosforila e ativa a proteína MAPK/ERK quinase (MEK) em 2 resíduos de serina no domínio-quinase, e a MEK quinase ativada fosforila e ativa a quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A proteína ERK ativada migra para o núcleo, controlando a ativação de fatores de transcrição envolvidos na proliferação e diferenciação celular como c-myc e e1k1 (DANKNER et al., 2018).

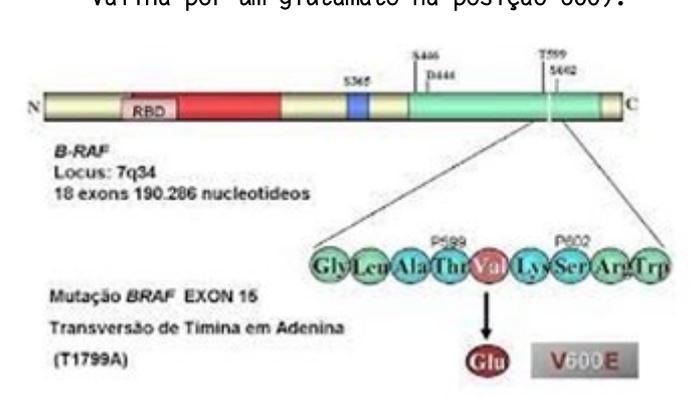
A proteína BRAF compartilha com ARAF e CRAF três regiões altamente conservadas denominadas CR1, CR2 e CR3. A região CR1 atua como auto inibidor do domínio BRAF quinase (CR3), e possui um domínio de ligação RAS-GTP (RBD) garantindo que a sinalização seja regulada. A região CR2 é rica em serina e treonina e atua como uma alça flexível entre CR1 e CR3. A região CR3 possui uma extremidade C-terminal envolvida com a ligação do ATP e conformação da forma BRAF inativa, através de interação entre o segmento de ativação (alfa hélice C que promove a interação RAS/RAF e dimerização de RAF) e a interface de dimerização, que favorece a homodimerização ou heterodimerização com outros membros da família RAF e RAS (LIU et al., 2020).

O BRAF está entre as quinases mais mutadas no câncer humano, onde 40-50% dos melanomas abrigam uma mutação ativadora em BRAF (DAVIES et al., 2002). Também é encontrado em 10-70% dos cânceres de tireóide (ARAQUE et al., 2020), 10% dos cânceres

colorretais (ENG, 2021) e 3-5% dos cânceres de pulmão de células não pequenas (LEONETTI et al., 2018).

O gene BRAF possui dois pontos quentes (hotspot) de mutação, localizados no domínio de ativação quinase (89% das mutações) e no laço rico em glicina do domínio quinase (11% das mutações). Estas mutações aumentam a atividade quinase da proteína, acelerando o processo de sinalização da via RAS/MAPK (DANKNER et al., 2018). A mutação mais comum (missense) de BRAF é a substituição da adenina para timina no nucleotídeo 1799 (T1799A), levando a substituição de um aminoácido valina por um ácido glutâmico na posição 600 (mutação BRAFV600E), que representa 90% das mutações observadas no exon 15. As mutações pontuais ativadoras de BRAF no domínio quinase se localizam nos exons 11 e 15, e a transversão T1799A representa mais de 80% de todas as mutações BRAF (Figura 4) (KNAUF et al., 2005; DANKNER et al., 2018).

Figura 4. Mutação BRAF. Esquema diagramático da mutação BRAF, tamanho e sua localização no cromossomo. Abaixo, a direita, a alteração na proteína quinase resultante (substituição de uma valina por um glutamato na posição 600).



Fonte: KNAUF et al., 2005.

Esta mutação é suficiente para conferir ativação constitutiva da BRAF, que simula a fosforilação do segmento de ativação quanto um aminoácido neutro (valina) é substituído por um aminoácido carregado negativamente na posição adjacente ao sítio de fosforilação da serina. Isto promove a ruptura das interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos no ponto de ligação do ATP que mantinha a conformação inativa (PISAPIA et al., 2020).

A mutação BRAF V600E leva a ativação constitutiva da via MEK inibindo a apoptose, e estimula a proliferação celular (DANKNER et al., 2018).

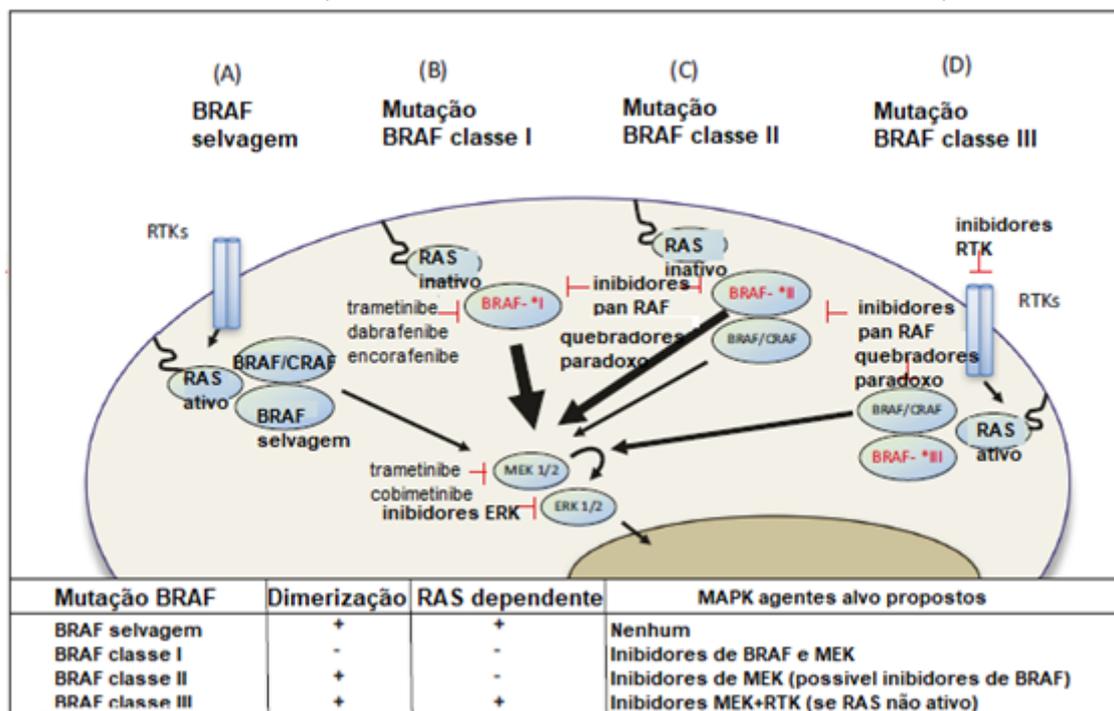
Inicialmente, o V-RAF foi identificado como um oncogene através da clonagem de um gene viral de camundongo que tinha a capacidade de transformar células NIH3T3 (RAPP et al., 1983). Seu ortólogo humano, BRAF, foi caracterizado e associado ao processo de transformação maligna. Mutações hotspot em BRAF envolvendo o códon V600 e códon não V600 foram caracterizados funcionalmente, demonstrando seu potencial oncogênico na transformação de células NIH3T3 (DAVIES et al., 2002), e posteriormente classificando-as por sua atividade de quinase intrínseca como sendo alta, intermediária ou prejudicada (WAN et al., 2004).

Os primeiros trabalhos também revelaram aumento da atividade CRAF em células que abrigam mutações não V600, particularmente aquelas com mutações prejudicadas pela quinase, que foi mediada por formação de dímeros BRAF/CRAF (GARNETT et al., 2005). Enquanto mutações BRAF V600E sinalizam como monômeros na ausência de RAS ativado (WAN et al., 2004), mutações BRAF não-V600 podem funcionar como dímeros. Estudos recentes propuseram uma classificação para as mutações BRAF segundo a capacidade de sinalizar como monômeros ou dímeros e sua dependência de sinalização RAS (DANKNER et al., 2018).

Classificação de mutações BRAF

As mutações BRAF ocorrem em aproximadamente 8% dos cânceres humanos (MENDIRATA et al., 2021) e podem ser classificadas em três classes (I, II e III), baseado em fatores bioquímicos e de sinalização; atividade de quinase; dependência de RAS e status de dimerização (Figura 5) (DANKNER et al., 2018).

Figura 5. Sinalização da via MAPK nas diferentes classes de mutação BRAF.



A. Na mutação BRAF selvagem, os receptores de tirosina quinases (RTK) ativam RAS e envolvem a cascata de transdução de sinal RAF/MEK/ERK.

B. Na mutação BRAF classe I ocorre desativação da sinalização RTK e RAS através da ativação da alça de feedback negativo a jusante do BRAF ativo constitutivamente. Os sinais de BRAF como monômero ativam a via MEK/ERK. Esta via pode ser alvo dos inibidores de BRAF (vemurafenibe e dabrafenibe) ou inibidores de MEK (cobimetinibe e dabrafenibe).

C. Na mutação BRAF classe II a sinalização RTK e RAS é prejudicada por feedback negativo, mas sinalizam como dímeros com BRAF e/ou CRAF ativando a via MEK/ERK. Esta via pode ser alvo dos inibidores de MEK (cobimetinibe e trametinibe), inibidores pan-RAF, ou inibidores de quebra de paradoxo.

D. Na mutação BRAF classe III a sinalização RTK e RAS é mantida, e funcionam como dímeros com BRAF e/ou CRAF. Mutantes de classe III BRAF exibem ligação a RAS e ativação de CRAF, levando ao engajamento da via MEK/ERK. Esta via pode ser alvo dos inibidores de RTK, inibidores pan-RAF, ou inibidores de quebra de paradoxo.

Fonte: DANKNER et al., 2018.

As mutações BRAF classe I são as mais identificadas em tumores humanos, e incluem as mutações BRAF V600D/E/K/R, que aumentam a atividade quinase do BRAF e ativação constitutiva de MAPK. Ensaios in vitro demonstraram que mutantes BRAF V600D/E têm atividade quinase aumentada 500 a 700 vezes em comparação com BRAF selvagem. A mutação V600E aumenta a atividade BRAF na porção C-terminal de CR3, imitando mudanças conformacionais que ocorrem durante a dimerização; assim a mutação BRAF V600E não depende da dimerização da molécula para aumentar a atividade quinase (DANKNER et al., 2018).

Mutações BRAF classe II e III não-V600

As mutações BRAF não-V600 são encontradas em 5-16% dos melanomas (SIROY et al., 2015). Aproximadamente 50-80% das mutações BRAF presentes nos carcinomas de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (SETO et al., 2020) e 22-30% dos cânceres colorretais (CRC) codificam para mutações BRAF não-V600 (OSUMI et al., 2019).

A caracterização *in vitro* de mutações BRAF não-V600 demonstraram dois subgrupos: 1) mutação BRAF classe II com atividade de quinase intermediária a alta; 2) e mutação BRAF classe III que não possuem ou possuem baixa atividade quinase (DANKNER et al., 2018).

As mutações BRAF classe II não-V600 induzem maior ativação da via MAPK quando comparado ao RAS oncogênico, mas exibem menos engajamento em relação ao BRAF V600D/E com maior ativação ao BRAF selvagem (WAN et al., 2004). Mutações BRAF classe II no segmento de ativação levam ao aumento da atividade quinase (LAVOIE, THERRIEN, 2015), e sinalizam como dímeros independentes de RAS (YAO et al., 2015).

As mutações BRAF classe III não-V600 têm atividade de quinase basal menor em comparação com BRAF selvagem (WAN et al., 2004), mas sinalizam como heterodímero com CRAF ou BRAF selvagem (YAO et al., 2015) dependente de RAS. As mutações BRAF classe III requerem ativação a montante de MAPK, e frequentemente coexistem com aberrações genéticas adicionais que produzem ativação a montante de RAS com perda de função de NF1 (YAO et al., 2017).

Fusões, deleções e outras mutações de BRAF

Além das mutações BRAF classe I, II e III, outras mutações missense foram identificadas (ZEHIR et al., 2017). Mutações que envolvem a deleção de BRAF foram relatadas como um mecanismo de resistência aos inibidores de BRAF+MEK no melanoma com mutação BRAF classe I, em 0,6-1% dos tumores pancreáticos (FOSTER et al., 2016) e tireoidianos (CHEN et al., 2016). Essas mutações consistem em deleções curtas adjacentes a α C hélice no domínio quinase do BRAF aumentando a atividade quinase, restringindo a α C hélice em sua conformação ativa. Eles sinalizam como monômeros independentes de RAS, funcionando de forma semelhante aos mutantes BRAF classe I (FOSTER et al., 2016).

Além das mutações missense e deleções de BRAF, fusões também foram relatadas. Fusões BRAF envolvendo o domínio quinase foram observados em 0,3% de amostras analisadas de melanoma, câncer de próstata e câncer gástrico (ROSS et al., 2016), e fusões conservadas foram relatadas em 85% dos astrocitomas pilocíticos (JONES et al., 2013). As fusões BRAF envolvem o truncamento do domínio auto inibitório CR1 N-terminal, levando a formação de dímeros ativos de BRAF que sinalizam de forma semelhante as mutações BRAF classe II (JONES et al., 2008).

Mutações BRAF e sua importância no câncer

A prevalência de mutações BRAF classe I, II e III varia amplamente conforme o tipo de câncer. O melanoma, CCR e NSCLC frequentemente expressam mutações BRAF. Dentro desses cânceres, uma alta porcentagem de mutações BRAF pertence a classe II (11,3%, 5,6%, 20,8%, respectivamente) e classe III (9,4%, 15,2%, 19,1%, respectivamente) (DANKNER et al., 2018).

Em modelos de camundongo geneticamente modificados de melanoma (GEM), a ativação constitutiva do BRAF V600E induz a hiperpigmentação da pele e o desenvolvimento de nevos (neoplasias melanocíticas benignas) (DANKORT et al., 2009). Em contraste, mutações BRAF não-V600 no modelo BRAF D594A GEM não produz hiperpigmentação e formação de nevos (HEIDORN et al., 2010) mas os animais desenvolvem pigmentos tumorais quando cruzados com um alelo KRAS G12D ativado. As mutações BRAF não-V600 se agrupam nos subgrupos com mutação em NRAS e NF1 (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015).

Nos modelos GEM com câncer de pulmão, a mutação BRAF V600E classe I promove o surgimento de adenomas pulmonares benignos que raramente evoluem para adenocarcinoma. No entanto, quando cruzados com camundongos portadores de mutações INK4A/ARF ou P53, desenvolvem adenocarcinoma (DANKORT et al., 2007). Mutações BRAF classe II (L597V) e classe III (D594A) promovem tumorigênese pulmonar quando expressas com mutações envolvendo KRAS. Mutantes BRAF classe II e III com tumores pulmonares apresentam atividade CRAF aumentada, implicando a importância dos dímeros BRAF-CRAF no apoio da função oncogênica de BRAF (NIETO et al., 2017). Pacientes com NSCLC que possuem mutações BRAF V600E foram associados a uma menor sobrevida em relação aos pacientes com BRAF selvagem (MARCHETTI et al., 2011).

A mutação BRAF é observada em 10% dos CRC, sendo 22% do tipo V600. Em humanos a mutação BRAF V600E define um subtipo molecular distinto de CRC associada a um mau prognóstico (HARADA, MORLOTE, 2020). Já tumores contendo mutações BRAF não-V600 e V600E representam subgrupos distintos. Pacientes com mutações BRAF não-V600 são mais jovens, apresentando tumores com menor grau de indiferenciação e sobrevida maior em comparação com pacientes com mutações V600E. Essas mutações têm sido associadas a uma má resposta aos anticorpos monoclonais anti-EGFR (DARIYA et al., 2020; GROTHEY et al., 2021). Já pacientes com mutação BRAF classe III (D594G) respondem aos inibidores de EGFR+quimioterapia (DE ROOCK et al., 2010). Independente de RAS, mutantes BRAF classe II são refratários a inibição de EGFR, semelhante aos mutantes BRAF classe I.

Inibidores de MAPK utilizados em mutações BRAF classe I

Existem dois inibidores da quinase serina-treonina do BRAF para pacientes com melanoma metastático com mutações BRAF classe I, o vemurafenibe e o dabrafenibe. Eles funcionam como inibidores competitivos de ATP reversíveis do domínio BRAF quinase. Nas células expressando a mutação BRAF V600 onde BRAF sinaliza como um monômero, a via MAPK é inibida por qualquer um desses agentes (ALQUATHAMA, 2020).

O vemurafenibe e o dabrafenibe produzem respostas iniciais objetivas em até 90% dos pacientes com melanoma com mutações BRAF V600E/K, mas não em melanomas com mutação BRAF selvagem. A resistência intrínseca aos inibidores de BRAF é observada em 50% dos pacientes com melanoma com mutação BRAF classe I. Apesar das altas taxas de resposta inicial em pacientes com melanoma contendo mutações BRAF V600 tratados com estes inibidores, a duração da resposta é baixa. Somente 10% dos pacientes tratados com vemurafenibe e o dabrafenibe atingem uma resposta completa (DOMINGUES et al., 2018).

Cerca de 20% dos pacientes com melanoma com mutação BRAF apresentam resistência intrínseca e não respondem ao vemurafenibe. Já a resistência adquirida aos inibidores de MAPK no melanoma com mutação BRAF V600 são estabelecidos através de mudanças que resultam na reativação da via MEK/ERK (DANKNER et al., 2018).

A amplificação ou regulação positiva de fatores de crescimento ou receptores de tirosina quinase (RTK), que sinalizam através das quinases da família SRC (SFK), podem levar a reativação e resistência da via. Da mesma forma, a aquisição de mutações secundárias em NRAS que sinaliza através de CRAF também podem levar a resistência, da mesma forma que a amplificação gênica ou splicing alternativo do RNA mensageiro de BRAF ou mutações em MEK (GIROTTI et al., 2015).

Pacientes com CRC BRAF V600E tratados com vemurafenibe são intrinsecamente resistentes em 95% dos casos (BAHRAMI et al., 2018), enquanto 70% dos pacientes com NSCLC (ALVAREZ et al., 2019) e câncer de tireóide tratados com dabrafenibe são intrinsecamente resistentes (ELIA et al., 2022).

Além dos medicamentos direcionados ao BRAF, existe uma classe de agentes terapêuticos que atuam especificamente sobre MEK, o substrato a jusante de BRAF na via MAPK (SOLIT et al., 2006). O trametinibe é um inibidor alostérico seletivo e reversível da atividade quinase e da ativação de MEK1 e MEK2 pelo BRAF (DANKNER et al., 2018). Os

inibidores de MEK como agentes isolados possuem um sucesso moderado, mas a combinação de inibidores de BRAF+MEK no tratamento do melanoma metastático com mutação BRAF classe I tem apresentado respostas mais duráveis e uma maior redução de comorbidades (DUMMER et al., 2020).

O hemifumarato de cobimetinibe é um inibidor alostérico seletivo que bloqueia a via MEK, possuindo alta afinidade de ligação e de inibição quando MEK se torna fosforilada. Em combinação com o vemurafenibe, inibe a reativação da MAPK da via MEK, resultando em uma inibição da sinalização mais potente comparado ao vemurafenibe isolado (ÁLAMO et al., 2021).

O encorafenibe é um inibidor seletivo das quinases RAF por mecanismo ATP-competitivo, suprimindo as vias RAF/MEK/ERK em células tumorais com mutação BRAF (V660E, D e K). O binimetinibe é um inibidor reversível da atividade quinase e da ativação de MEK reguladas pelo sinal extracelular ativado por mitógeno por mecanismo ATP não competitivo. A combinação de inibidor de BRAF (encorafenibe) e inibidor de MEK (binimetinibe) apresenta uma boa resposta em pacientes com melanoma (ASCIERTO et al., 2020).

Estas combinações de inibidores de BRAF+MEK produzem respostas favoráveis em 60-70% dos SNCLC ou melanoma metastático com mutação BRAF V600, mas apenas 12% de resposta em pacientes com CRC (DANKNER et al., 2018). A resistência intrínseca do CRC com mutação BRAF classe I aos inibidores de MAPK é governada em parte pela sinalização do EGFR e ativação a jusante de CRAF. Isso leva a fosforilação de ERK mesmo na presença de inibidores de BRAF (CORCORAN et al., 2018).

As combinações de inibidores de BRAF+MEK+EGFR são mais promissoras no CRC, com 41% dos pacientes respondendo a combinação encorafenibe, binimetinibe e cetuximabe. Contudo, nos CRC ocorrem altos níveis de sinalização a montante de RTK ou RAS, fazendo com que a inibição de BRAF seja menos eficaz (KOPETZ et al., 2019).

Em contraste com as células cancerosas mutantes BRAF V600, o vemurafenibe e dabrafenibe provocam diferentes respostas em tumores BRAF selvagem, onde o BRAF sinaliza como um dímero, evidente no contexto da ativação do RAS, seja por mutação ou sinais a montante de RTK (CORCORAN et al., 2018). A ligação desses inibidores de BRAF a uma molécula RAF dentro do dímero ativa alostericamente a outra, resultando em aumento da atividade RAF e ativação paradoxal de ERK (BHARGAVA et al., 2016).

Embora os inibidores de BRAF inibam a sinalização MEK/ERK, eles ativam a sinalização MEK/ERK em células com mutação RAS. Isso ocorre porque na presença de RAS oncogênico, os inibidores de BRAF impulsionam a formação de heterodímeros BRAF-CRAF contendo uma molécula que está ligada ao medicamento e uma molécula que está livre do medicamento. A molécula ligada ao medicamento impulsiona a ativação da molécula livre do medicamento por meio de alterações conformacionais, ativando o CRAF e estimulando a hiperativação de MEK e ERK. Esta ativação paradoxal da via pode estimular o crescimento e a progressão tumoral (DANKNER et al., 2018). Uma importante consequência clínica da ativação paradoxal da via MAPK é uma incidência aumentada de carcinomas cutâneos de células escamosas (SCC) em pacientes recebendo inibidores de BRAF. Estes SCC frequentemente expressam mutações NRAS ativadoras, e os inibidores de BRAF aumentam a atividade da MAPK e aceleraram o crescimento do tumor (FLAHERTY et al., 2010). Pacientes tratados com inibidores de BRAF+MEK são menos propensos a desenvolver SCC (SU et al., 2012).

Inibidores de MAPK utilizados em mutações BRAF classe II

Normalmente mutações BRAF classe I sinalizam como monômeros, mas a presença de resistência dos tumores BRAF classe I aos inibidores de BRAF pode ser causada pela dimerização, com ativação MAPK a montante ou por splicing aberrante de BRAF (NAZARIAN et al., 2010). Já mutações classe II e III sinalizam como dímeros de RAF, tornando-os resistente aos inibidores de BRAF (FLAHERTY et al., 2010; DANKNER et al., 2018). Apesar

desse paradigma, existem relatos de respostas em clínicas em pacientes portadores de melanomas com mutações BRAF não-V600 (BRAF L597R, L597S, D594G e T599I) ao vemurafenibe. Porém, existem relatos de pacientes com mutação BRAF tratados com inibidores de MAPK que não apresentaram resposta clínica favorável (DANKNER et al., 2018). Embora os inibidores de BRAF não sejam eficientes na inibição da via MAPK em melanomas BRAF classe II em relação as mutações classe I, podem fornecer benefício clínico quando usado em combinação com inibidores de MEK (dabrafenibe e trametinibe) (DUMMER et al., 2020).

Inibidores BRAF quebradores de paradoxo

Para o tratamento de tumores com ativação paradoxal, uma nova classe de inibidores de BRAF, denominados “quebradores de paradoxo” foi desenvolvido. Esses inibidores prejudicam a dimerização do BRAF formando um contato mais próximo com a Leu505 no domínio da quinase BRAF em comparação com o vemurafenibe. A Leu505 contribui com o domínio quinase de BRAF, e a ligação dos inibidores de BRAF “quebradores de paradoxo” (CCT196969, CCT241161) para este resíduo levam ao deslocamento para fora da α C hélice e dimerização prejudicada (GIROTTI et al., 2015). Os inibidores de BRAF “quebradores de paradoxo” de próxima geração (PLX8394) são igualmente potentes quando comparados ao vemurafenibe na inibição da via MAPK em células mutantes BRAF V600, evitando a resistência ao vemurafenibe (HARTSOUGH et al., 2018).

Inibidores de pan-RAF

Os inibidores de pan-RAF têm como alvo todas as isoformas de RAF, e foram criados para superar a ativação paradoxal. Estas moléculas são capazes de inibir os monômeros e dímeros de BRAF e outras moléculas da família RAF (DANKNER et al., 2018). A eficácia dos inibidores pan-RAF para classe II e III mutantes BRAF foram demonstrados em linhagens celulares de NSCLC expressando mutação BRAF classe II (G469A) e classe III (G466V) na combinação do dabrafenibe e trametinibe com o inibidor pan-RAF, PLX8394 (NOEPARAST et al., 2016; OKIMOTO et al., 2016). Células com mutações BRAF classe II (L597V, K601E) e classe III (G466E) são resistentes ao vemurafenibe, mas sensíveis aos inibidores pan-RAF (KAROULIA et al., 2016). Os inibidores de pan-RAF podem ser indicados no tratamento de tumores com mutação BRAF resistente ao vemurafenibe, como melanomas BRAF V600, classe II e III; CRC e NSCLC (DANKNER et al., 2018; GAMPA et al., 2019; SATURNO et al., 2021).

Terapias para mutações BRAF classe III

Mutações BRAF classe III são capazes de ativar ERK em níveis mais altos do que o BRAF selvagem pelo aumento da ligação ao RAS e dimerização com CRAF. Células com mutação BRAF classe III tratadas in vitro com inibidores de BRAF resultam em uma redução modesta na fosfo-ERK e ausência de ativação paradoxal (YAO et al., 2017; DANKNER et al., 2018). Nos tumores com mutação BRAF classe III, dímeros mutantes-CRAF seriam direcionados por inibidores de BRAF, enquanto os dímeros endógenos de CRAF estariam sujeitos a ativação paradoxal. Portanto, os níveis de proteína mutante BRAF ditariam o grau de inibição da via MAPK (YAO et al., 2017), como visto em pacientes com mutação BRAF classe III que não respondem aos inibidores de BRAF e/ou MEK (CARRERA et al., 2015). As mutações BRAF classe III dependem da sinalização via RAS, podendo ser tratadas pela inibição da sinalização de RAS e MAPK a jusante (YAO et al., 2017). Como no CRC a sinalização RAS é uma consequência da ativação de RTK a montante, os tumores podem ser tratados com inibidores de RTK+MEK (DANKNER et al., 2018).

Combinações de terapias para tumores BRAF

O tratamento *in vitro* de células com mutação BRAF classe III com inibidores de MEK foi realizado com sucesso na alteração da regulação de genes da via PI3K/mTOR (POSCH et al., 2013), em linhagens de melanoma, NSCLC e CCR com inibidores de MEK e de PI3K/mTOR com ou sem mutação da via PI3K/AKT (RITTLER et al., 2020).

A combinação trametinibe+omipalisibe (inibidor de PI3K) inibe o crescimento de linhagem celular de melanoma com mutação BRAF classe III (POSCH et al., 2013). Entretanto, este regime tem sido limitado pela sua baixa tolerabilidade (GRILLEY-OLSON et al., 2016).

A glicoproteína B de melanoma não metastático (GPNMB) é uma glicoproteína transmembrana expressa nos tecidos ósseo, cutâneo e hematopoiético, e em tumores como melanoma, carcinoma hepatocelular, glioma, carcinoma mamário e pulmonar. A utilização de inibidores de BRAF+MEK aumentam a expressão de GPNMB em tumores com mutação BRAF selvagem, V600 e não-V600, o que permite que as células cresçam com características osteomiméticas e sobre tecidos ósseos (DANKNER et al., 2018; TAYA, HAMMES, 2018).

O glembatumumabe vedotine (CDX-011 ou CR011-vcMMAE) é um conjugado anticorpo-fármaco (IgG2 humano conjugado com monometil auristatina E) contra a GPNMB, utilizado em pacientes com câncer de mama. Seu uso no melanoma com mutação BRAF se mostrou inicialmente promissor, sugerindo que a combinação de inibidores de MAPK+glembatumumabe vedotine fosse benéfico sobre tumores com mutações BRAF classe I, II ou III (ROSE et al., 2016). Porém, em um estudo de fase II utilizando o glembatumumabe vedotine envolvendo pacientes com melanoma em estágio IV refratários aos inibidores de BRAF, MEK e de pontos de checagem imunológica, a atividade antitumoral se apresentou modesta (OTT et al., 2019). Recentemente, a associação de quimioterápicos e/ou inibidores de pontos imunológicos com inibidores de MAPK/BRAF ou MEK/BRAF demonstrou resposta clínica favorável no melanoma (RIBAS et al. 2019), NSCLC (ARBOUR, RIELY, 2019) e CCR (KOPETZ et al., 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compreender as respostas aos inibidores de BRAF e de MEK em tumores portadores de mutações BRAF classe II e III continuam sendo um importante via de investigação. Existe um crescente corpo de evidências indicando que pacientes com tumores com mutações BRAF classe II e III podem se beneficiar pelo uso de inibidores de MAPK. As novas combinações de inibidores de MAPK, como RTK, pan-RAF, quebradores de paradoxo, e inibidores de ERK, são necessários para determinar qual a melhor terapia contra as várias classes mutantes de BRAF.

REFERÊNCIAS

- ÁLAMO, M.D.C.; et al. Durable response to vemurafenibe and cobimetinibe for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma in routine clinical practice. *Oncotargets Ther.* v.14, p.5345-5352, 2021.
- ALQUATHAMA, A. BRAF in malignant melanoma progression and metastasis: potentials challenges. *Am J Cancer Res.* v.10, n.4, p.1103-1114, 2020.
- ALVAREZ, J.G.B.; et al. Agents to treat BRAF-mutant lung cancer. *Drugs Context.* v.8, p.212566, 2019.
- ARAQUE, K.A.; et al. Update on the management of thyroid cancer. *Horm Metab Res.* v.52, n.8, p.562-577, 2020.
- ARBOUR, K.C.; RIELY, G.J. Systemic therapy for locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer: a review. *JAMA.* V.322, n.8, p.764-774, 2019.

- ASCIERTO, P.A.; et al. Update on tolerability and overall survival in COLUMBUS: landmark analysis of a randomized phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib vs vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF V600-mutant melanoma. *Eur J Cancer*. v.126, p.33-44, 2020.
- BAHRAMI, A.; et al. The therapeutic potential of targeting the BRAF mutation in patients with colorectal cancer. *J Cell Physiol*. v.233, n.3, p.2162-2169, 2018.
- BHARGAVA, A.; et al. Registered report: RAF inhibitor prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Elife*. V.5, p.e09976, 2016.
- CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*. v.161, n.7, p.1681-1696, 2015.
- CARRERA, C.; et al. Multiple BRAF wild-type melanomas during dabrafenib treatment for metastatic BRAF-mutant melanoma. *JAMA Dermatol*. V.151, n.5, p.544-548, 2015.
- CHEN, S.H.; et al. Oncogenic BRAF deletions that function as homodimers and are sensitive to inhibition by RAF dimer inhibitor LY3009120. *Cancer Discov*. V.6, n.3, p.300-315, 2016.
- CORCORAN, R.B.; et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK inhibition in patients with BRAF (V600E)-mutant colorectal cancer. *Cancer Discov*. V.4, p.428-443, 2018.
- DANKNER, M.; et al. Classification BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene*. v.37, n.24, p.3183-3199, 2018.
- DANKORT, D.; et al. BRAF(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet*. v.41, n.5, p.544-552, 2009.
- DANKORT, D.; et al., A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev*. v.21, n.4, p.379-384, 2007.
- DARIYA, B.; et al. Colorectal cancer biology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Crit Rev Oncog*. V.25, n.2, p.71-94, 2020.
- DAVIES, H.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. v.417, n.6892, p.949-954, 2002.
- DE ROOCK, W.; et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutation on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. v.11, n.8, p.753-762, 2010.
- DHOMEN, N.; MARAIS, R. BRAF Signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. v. 23, p. 529-545, 2009.
- DOMINGUES, B.; et al. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*. v.7, p.35-49, 2018.
- DUMMER, R.; et al. Five-year Analysis of adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III melanoma. *N Engl J Med*. v.383, n.12, p.1139-1148, 2020.
- ELIA, G.; et al. Advances in pharmacotherapy for advanced thyroid cancer of follicular origin (PTC, FTC). New approved drugs and future therapies. *Expert Opin Pharmacother*. v.21, p.1-12, 2022.
- ENG, C. BRAF mutation in colorectal cancer: an enigmatic target. *J Clin Oncol*. v.39, n.4, p.259-261, 2021.
- FLAHERTY, K.T.; et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. v.363, n.9, p.809-819, 2010.

- FOSTER, S.A.; et al. Activation mechanism of oncogenic deletion mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell*. v.29, n.4, p.477-493, 2016.
- GAMPA, G.; et al. Brain distribution and active efflux of three panRAF inhibitors: considerations in the treatment of melanoma brain metastases. *J Pharmacol Exp Ther*. v.368, n.3, p.446-461, 2019.
- GARNETT, M.J.; et al. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell*. v.20, n.6, p.963-969, 2005.
- GIROTTI, M.R.; et al. Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma. *Cancer Cell*. v.27, n.1, p.85-96, 2015.
- GRILLEY-OLSON, J.E.; et al. A phase Ib dose-escalation study of the MEK inhibitor trametinib in combination with the PI3K/mTOR inhibitor GSK2126458 in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. v.34, n.6, p.740-749, 2016.
- GROTHEY, A.; et al. Management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer: a review of treatment options and evidence-based guidelines. *Ann Oncol*. v.32, n.8, p.959-967, 2021.
- HARADA, S.; MORLOTE, D. Molecular pathology of colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*. v.27, n.1, p.20-26, 2020.
- HARTSOUGH, E.J.; et al. Response and resistance to paradox-breaking BRAF inhibitor in melanomas in vivo and ex vivo. *Mol Cancer Ther*. v.17, n.1, p.84-95, 2018.
- HEIDORN, S.J.; et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*. v.140, n.2, p.209-221, 2010.
- JONES, D.T.; et al. Recurrent somatic alterations of FGR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet*. v.45, n.8, p.927-932, 2013.
- JONES, D.T.; et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*. v.68, n.21, p.8673-8677, 2008.
- KAROULIA, Z.; et al. An integrated model of RAF inhibitor action predicts inhibitor activity against oncogenic BRAF signaling. *Cancer Cell*. v.30, n.3, p.485-498, 2016.
- KNAUF, J.A.; et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res*. v.65, n.10, p.4238-4245, 2005.
- KOPETZ, S.; et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol*. v.39, n.4, p.285-294, 2021.
- KOPETZ, S.; et al. Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAF V600E-mutated colorectal cancer. *N Engl J Med*. v.381, n.17, p.1632-1643, 2019.
- LAVOIE, H.; THERRIEN, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v.16, n.5, p.281-298, 2015.
- LEONETTI, A.; et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev*. v.66, p.82-94, 2018.
- LIU, H.; et al. BRAF mutation and its inhibitor in sarcoma treatment. *Cancer Med*. v.9, n.14, p.4881-4896, 2020.
- MARCHETTI, A.; et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. v.29, n.26, p.3574-3579, 2011.

- MENDIRATA, G.; et al. Cancer gene mutation frequencies for the US population. *Nat Commun.* v.12, n.1, p.5961, 2021.
- NA, S.; et al. A-Raf: A new star of the family of RAF kinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* v.50, n.6, p.520-531, 2015.
- NAZARIAN, R.; et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* v.468, n.7326, p.973-977, 2010.
- NIETO, P.; et al., A Braf kinase-inactive mutant induces lung adenocarcinoma. *Nature.* v.548, n.7666, p.239-243, 2017.
- NOEPARAST, A.; et al. Non-V600 BRAF mutation recurrently found in lung cancer predict sensitivity to the combination of trametinib and dabrafenib. *Oncotarget.* v.8, n.36, p.60094-60108.
- OKIMOTO, R.A.; et al. Preclinical efficacy of a RAF inhibitor that evades paradoxical MAPK pathway activation in protein kinase BRAF-mutant lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.113, n.47, p.1356-1346, 2016.
- OSUMI, H.; et al. Non-V600E BRAF mutation and EGFR Signaling pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer.* v.145, n.9, p.2488-2499, 2019.
- OTT, P.A.; et al. A phase 2 study of glematumumabe vedotin, an antibody-drug conjugate targeting glycoprotein NMB, in patients with advanced melanoma. *Cancer.* v.125, n.7, p.1113-1123, 2019.
- PISAPIA, P.; et al. BRAF: a two-faced Janus. *Cells.* V.9, n.21, p.2549, 2020.
- POSCH, C.; et al. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.110, n.10, p.4015-4020, 2013.
- RAPP, U.R.; et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.80, n.14, p.4218-4222, 1983.
- RIBAS, A.; et al. Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma. *Nat Med.* v.25, n.6, p.936-940, 2019.
- RITTLER, D.; et al. Horizontal combination of MEK and PI3K/mTOR inhibition in BRAF mutant tumor cells with or without concomitant PI3K pathway mutations. *Int J Mol Sci.* v.21, n.20, p.7649, 2020.
- ROSE, A.A.; et al. MAPK pathway inhibitors sensitize BRAF-mutant melanoma to an antibody-drug conjugate targeting GPNMB. *Clin Cancer Res.* v.22, n.24, p.6088-6098, 2016.
- ROSS, J.S.; et al. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to target therapy. *Int J Cancer.* v.138, n.4, p.881-890, 2016.
- SATURNO, G.; et al. The paradox-breaking panRAF plus family kinase inhibitor, CCT3833, is effective in mutant KRAS-driven cancers. *Ann Oncol.* v.32, n.2, p.269-278, 2021.
- SETO, K.; et al. Negative reactions of BRAF mutation-specific immunohistochemistry to non-V600E mutations of BRAF. *Pathol Int.* v.70, n.5, p.253-261, 2020.
- SIROY, A.E.; et al. Beyond BARF (V600E): clinical mutation panel testing by next-generation sequencing in advanced melanoma. *J Invest Dermatol.* v.135, n.2, p.508-515, 2015.
- SOLIT, D.B.; et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature.* v.439, n.7074, p.358-362, 2006.

SU, F.; et al. RAS mutation in cutaneous squamous-cell carcinoma in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med.* v.366, n.3, p.207-215, 2012.

TAYA, M.; HAMMES, S.R. Glycoprotein non-metastatic melanoma protein B (GPNMB) and cancer: a novel potential therapeutic target. *Steroids.* v.133, p.102-107, 2018.

WAN, P.T.; et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK Signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* v.116, n.6, p.855-867, 2004.

YAO, Z.; et al. BRAF mutants evade ERK-dependent feedback by different mechanisms that determine their sensitivity to pharmacologic inhibition. *Cancer Cell.* v.28, n.3, p.370-387, 2015.

YAO, Z.; et al. Tumors with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature.* v.548, n.7666, p.234-238, 2017.

ZEHIR, A.; et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10.000 patients. *Nat Med.* v.23, n.6, p.703-713, 2017.