



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO: Intervención de los microRNAs en el desarrollo de melanoma y su aplicación en la prevención de resistencias frente a la terapia dirigida

Autora: Elba del Val Oriza

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

Convocatoria: Junio 2018

RESUMEN

Hasta el año 2010, el pronóstico de los pacientes con melanoma en estadio IV era poco esperanzador, pues la quimioterapia “tradicional” ofrecía respuestas muy bajas y conseguía supervivencias aún menores. Sin embargo, el avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas permitió el desarrollo de la terapia dirigida frente a la proteína BRAF de la vía MAPK/ERK, que logró resultados sin precedentes en este tipo de cáncer. No obstante, al cabo del tiempo comenzaron a aparecer resistencias. En la actualidad, la terapia de elección en melanoma metastásico es o bien la combinación de dos inhibidores de la vía MAPK/ERK, o bien la inmunoterapia. Sin embargo, los pacientes siguen progresando, lo cual puede ser debido a un conocimiento incompleto de los mecanismos que subyacen en el melanoma. En este sentido, investigaciones recientes apuntan a que la desregulación en el perfil de microRNAs es responsable de una serie de alteraciones en la vía MAPK/ERK que contribuyen a la progresión del cáncer. miR-524-5p y miR-579-3p son dos de los microRNAs que muestran menores niveles en melanoma, y ciertos estudios apuntan a que el restablecimiento de sus niveles basales podría ser capaz de revertir el fenotipo maligno y de ayudar a prevenir la aparición de resistencias frente a la terapia dirigida, así como de vencerlas una vez establecidas.

Palabras clave: “melanoma”, “microRNA”, “treatment” y “drug resistance”.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Contextualización y antecedentes

El melanoma es una neoplasia de los melanocitos que en la mayoría de los casos se localiza en la piel (95%) (1), (2). Representa el 4% de los tumores malignos de este órgano, pero sin embargo es responsable del 80% de las muertes debidas al cáncer de piel (2). El melanoma afecta en mayor medida a la población blanca, detectándose más del 80% de los casos en Australia, Norteamérica y Europa (3). La incidencia en España es de 9,7 casos por cada 100.000 habitantes, siendo más común en mujeres (57,2%) que en hombres (42,8%) (2).

El desarrollo de un melanoma consta de dos fases: extensión radial y crecimiento vertical. En la primera, las células tumorales se encuentran confinadas en la epidermis, por lo que su comportamiento es indolente y son escasas las posibilidades de metastatizar. La segunda etapa, por el contrario, tiene peor pronóstico, pues en esta sí cabe la posibilidad de invasión linfática y hematogena (2). El melanoma metastásico se origina a partir de los melanocitos en fase de crecimiento vertical. Las metástasis iniciales suelen afectar a los

nódulos linfáticos regionales, pero en fases avanzadas puede verse afectado casi cualquier órgano. Aunque la mayor parte de los melanomas se diagnostican en fases tempranas, un porcentaje nada desdeñable (19-25%) recidivan o debutan en situación avanzada locorregional y/o a distancia (4).

El cribado del melanoma es fundamentalmente clínico (criterios ABCDE), y ante cualquier sospecha de lesión cutánea carcinogénica o presencia de alto riesgo de melanoma por elevado número de factores de riesgo, se procede a la realización de un estudio anatómopatológico (2). El análisis de la lesión primaria y las exploraciones complementarias permiten clasificar el melanoma en estadios, que son el factor pronóstico más importante y en función del cual se escoge la línea terapéutica (2). La American Joint Cancer Comision (AJCC/UICC) es quien rige el estadiaje del melanoma, y para ello valora: grosor de Breslow, que mide el crecimiento vertical del melanoma (T: tamaño), afectación ganglionar (N) y metástasis a distancia (M). No obstante, el pronóstico de un paciente con melanoma también depende de otros parámetros, como la ulceración, la tasa de mitosis dérmica, el infiltrado linfocítico o la ubicación, entre otros. En los estadios 0, I y II las células tumorales se sitúan en la epidermis y no hay propagación a ganglios linfáticos ni a lugares distantes. En el estadio III los ganglios linfáticos se encuentran afectados y/o hay presencia de tumores satélite alrededor de la lesión principal. Por último, en el estadio IV hay propagación a ganglios linfáticos distantes o a órganos como los pulmones, el hígado o el cerebro (5).

El tratamiento principal en los estadios I, II y III es la cirugía, tanto exéresis del tumor primario como linfadenectomía regional. Además, en función de la situación del paciente, esta puede ir acompañada de terapia adyuvante locorregional (radioterapia) o sistémica (fármacos de primera línea en melanoma de estadio IV) (6). El tratamiento de elección en la enfermedad metastásica (estadio IV) son los antineoplásicos. La primera terapia sistémica que se utilizó frente al melanoma fue la quimioterapia basada en dacarbazina y fotemustina (7). También se utilizó de forma extendida la interleucina-2 (IL-2). Sin embargo, la quimioterapia “tradicional” en melanoma se caracteriza por producir respuestas objetivas (RO) en menos del 10% de los pacientes y apenas contribuir a prolongar la supervivencia global (SG) (mediana de 6-9 meses) (8), (9). Hasta el año 2010, este era el panorama al cual se enfrentaban personal médico y pacientes cuando se realizaba un diagnóstico de melanoma metastásico (10). Sin embargo, gracias a los avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas y de las vías de señalización, la quimioterapia “tradicional” representa el pasado del tratamiento del melanoma metastásico.

1.2. Tratamiento actual del melanoma metastásico

1.2.1. Terapia dirigida

Las células cancerosas melanocíticas poseen muchas alteraciones genéticas, y el número va en aumento a medida que el cáncer progresa. En este sentido, la identificación de mutaciones conductoras (“driver mutations”) cambió la terapéutica del melanoma, ya que la inhibición de uno de estos oncogenes es en muchas ocasiones suficiente para inducir una regresión tumoral, debido a su gran impacto en las vías de proliferación y supervivencia (10). A pesar de que cada vez son más las que se incorporan a la lista, sin duda alguna la mutación conductora líder es la que se descubrió en el año 2002, y que afecta a la quinasa BRAF de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK) (10). BRAF, un miembro de la familia de las proteínas RAF (A,B, C-RAF), es la principal efectora de RAS en la vía MAPK/ERK. Cuando BRAF es activada por RAS, esta interactúa con CRAF para activar a MEK, que a su vez extiende la señal mitogénica para activar a ERK. Por último, ERK se trasloca al núcleo celular, donde activa diferentes programas genéticos de la vía relacionados con el crecimiento y la supervivencia (11) (Ver Figura 1).

La mutación en BRAF es dominante y tiene una responsabilidad muy alta en el desarrollo de melanoma, pues produce una activación constitutiva de la quinasa BRAF, que a su vez promueve la hiperactivación de la vía MAPK/ERK. Además, el 40-60% de los pacientes con melanoma poseen mutado el gen BRAF (12). De ellos, el 90% portan una sustitución en la valina 600 por ácido glutámico (V600E) (13). El descubrimiento de esta mutación fue la que aportó evidencia para el desarrollo de inhibidores selectivos de BRAF V600 mutado (iBRAF), y más tarde también para el de inhibidores de MEK (iMEK).

Otras mutaciones conductoras afectan a conocidos genes, como NRAS, PTEN o NF1, y a otros no tan conocidos y de creciente trascendencia en el melanoma, como MITF (10).

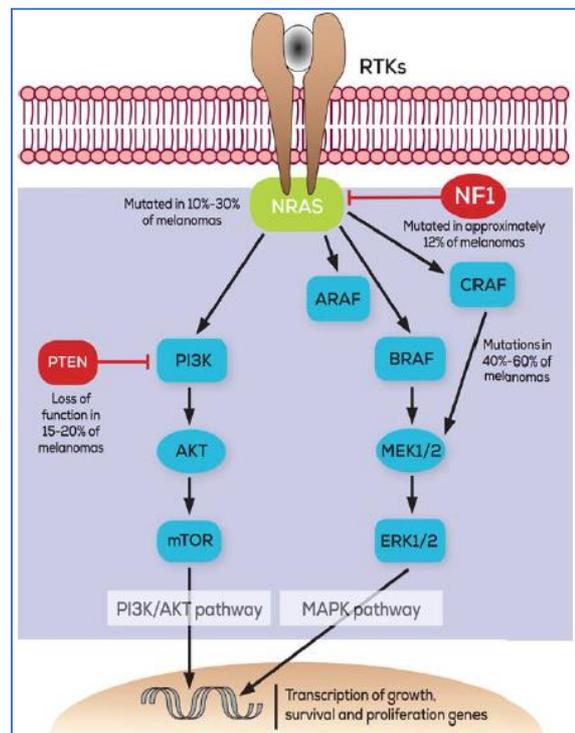


Figura 1. Recurrent mutations in melanoma affecting the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways (10).

1.2.2. Inmunoterapia

El cáncer es un sistema dinámico que se adapta al medio a través de la adquisición progresiva de distintas capacidades. El sistema inmune es una red interconectada de células y moléculas cuya función es detectar cambios que puedan poner en peligro al organismo y generar respuestas adaptadas para suprimir o hacer compatible dicho cambio con la supervivencia. Por lo tanto, el cáncer y el sistema inmune son dos sistemas dinámicos adaptativos. Las terapias convencionales frente al cáncer, por el contrario, son sistemas estáticos y por tanto incapaces de adaptarse a los mecanismos de resistencia que se generan en la célula tumoral por presión selectiva de la intervención terapéutica (14).

La inmunoterapia permite manipular la relación entre el sistema inmune y el cáncer, y busca reconducirla hacia el equilibrio (latencia tumoral) o hacia la eliminación del tumor. Las células cancerosas melanocíticas se diferencian muy bien a ojos del sistema inmunitario porque tienen muchas alteraciones genéticas. Por esta razón, los melanomas suelen tener una alta tasa de infiltración linfocitaria. En melanoma, la inmunoterapia pretende potenciar la respuesta de los linfocitos T CD8+ por medio del bloqueo de sus receptores PD-1 y CTLA-4 (“immune checkpoints”), evitando así su unión a los ligandos PD-L1/PD-L2 y CD80/CD86, respectivamente, que se encuentran sobreexpresados en las células tumorales. El melanoma en estadio IV fue el primer cáncer que se benefició de la inmunoterapia basada en anticuerpos (15).

La irrupción de la terapia dirigida y de la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del melanoma metastásico en los últimos años debido al notable incremento en la duración de las RO y de la SG y supervivencia libre de progresión (SLP) (16). Ambas son primera línea de tratamiento en melanoma metastático, y utilizar una u otra depende de si el paciente posee o no la mutación BRAF (en el caso de que la mutación sea positiva se inicia con terapia dirigida, y en caso contrario con inmunoterapia) (Ver Figura 2).

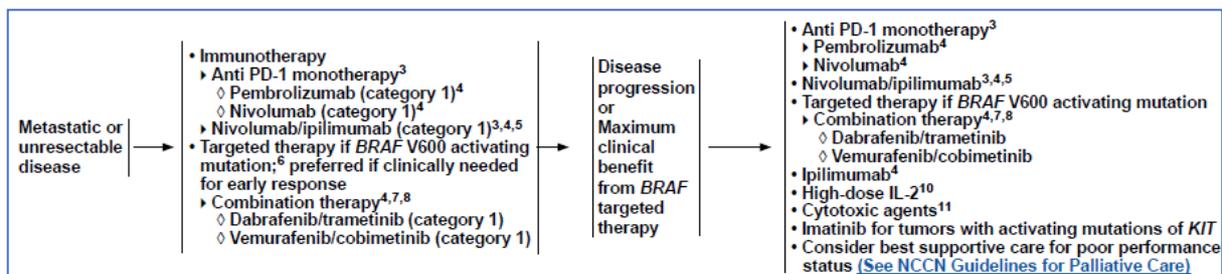


Figura 2. Systemic therapy for metastatic or unresectable melanoma (6).

Sin embargo, a pesar de que la inhibición de la proteína BRAF mutada con inhibidores selectivos de la quinasa ha logrado la consecución de respuestas terapéuticas y mejoras en la SG y SLP sin precedentes en pacientes con melanoma metastásico BRAF V600E (17), más tarde se ha visto que la duración de la respuesta a la terapia es limitada y la mediana de la SLP es únicamente de 6-8 meses, debido al desarrollo de resistencias terapéuticas (18). Por su parte, la inmunoterapia tampoco está exenta de resistencias, y además presenta una serie de reacciones adversas que no siempre son toleradas por los pacientes, tales como colitis, hepatitis, neumonitis, nefritis o hipo e hipertiroidismo. Además, aún no se disponen de biomarcadores adecuados que permitan seleccionar a los pacientes que se pueden beneficiar de la inmunoterapia.

1.3. ¿Y ahora qué?

El dogma central de la biología molecular dice que la información genética fluye unidireccionalmente de DNA, a RNA mensajero (mRNA) y a proteínas. En consecuencia, durante muchos años la mayoría de la investigación estuvo centrada en los genes codificantes de proteínas y en sus transcriptos, el mRNA. No obstante, tiempo después se vio que a pesar de que más del 90% del DNA puede ser transcrito, únicamente el 2% codifica proteínas (19). A pesar de la enorme diferencia cuantitativa, este hecho fue ignorado mucho tiempo y se llegó a calificar al DNA que no codifica proteínas como “DNA basura”. Sin embargo, hoy en día se sabe que la mayoría de los transcriptos que no codifican proteínas no son simple ruido, sino que se trata de RNA no codificante (ncRNA) con importantes funciones en la regulación de los procesos celulares (20).

El ncRNA ha sido el protagonista indiscutible del estudio de la maquinaria de regulación postranscripcional de las células eucariotas durante las dos últimas décadas, y además se ha visto que tiene gran implicación en la oncogénesis (20). En función del número de nucleótidos, el ncRNA puede ser clasificado en tres categorías: “short ncRNAs”, “middle-size ncRNAs” y “long ncRNAs” (21). Dentro de la primera se encuentran los microRNAs (miRNAs/miR), que poseen un tamaño de 19-25 nucleótidos y cuya función biológica es regular negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional (22).

Los miRNAs son el ncRNA más expresado en los tejidos somáticos eucariotas (23), y en la actualidad se han convertido en el epicentro de la gran mayoría de los estudios sobre ncRNA. Se han identificado más de 2.500 miRNAs humanos (24) y los análisis bioinformáticos indican que regulan más de 5.300 genes, lo cual representa al 30% de todos los genes humanos (25). Se describieron por primera vez en el año 1993, cuando

investigadores de la Universidad de Harvard observaron en *Caenorhabditis elegans* que lin-4, un tipo de RNA que no codificaba para ninguna proteína, controlaba los niveles de la proteína LIN-14 y de esta forma dirigía la transición entre los diferentes estados larvarios (26).

El mecanismo de acción de los miRNAs consiste en bloquear la traducción y en promover la deadenilación y degradación del mRNA, junto con el complejo RISC. El reconocimiento del mRNA se lleva a cabo mediante la interacción entre el extremo 5' (posición 2 a 8) del miRNA, denominado "seed region", y la región no codificante 3' UTR de los mRNAs (16). La complementariedad puede ser perfecta o imperfecta, pero en mamíferos lo más habitual es que se de el segundo caso (27). Hoy en día se sabe que todos los mRNAs tienen sitios de unión a miRNAs, algunos conservados y otros no (16). Los miRNAs tienen efectos pleiotrópicos normalmente, es decir, que un único miRNA es capaz de regular la expresión de varios mRNAs (24). Este hecho explica el gran potencial regulador de la expresión génica que presentan, ya que se piensa que cada miRNA regula alrededor de 200 genes (28), y la multitud de vías de señalización que pueden llegar a afectar. Además, una misma vía de señalización puede estar regulada por varios miRNAs que pueden trabajar coordinadamente, o no (29).

Los miRNA se clasifican generalmente como intergénicos o intrónicos en función de su ubicación genómica, y normalmente están situados en clusters. Se sabe que los miRNA intergénicos se transcriben como unidades de transcripción independientes, mientras que se cree que los miRNA intrónicos se procesan a partir de los intrones de sus unidades de transcripción hospedadoras y, por lo tanto, comparten mecanismos reguladores y patrones de expresión comunes con su gen hospedador (30). Los miRNAs de un mismo cluster son transcritos a la vez, pero las unidades individuales maduras pueden estar reguladas postranscripcionalmente de manera independiente (31). Se sabe que numerosos factores de transcripción, como p53, MYC, ZEB1 o ZEB2, son reguladores positivos o negativos de la expresión de miRNAs (31). También se sabe que están sometidos a regulación epigenética (16). Por lo tanto, los miRNAs no solo ofrecen una regulación precisa y compleja de la expresión génica, sino que ellos mismos también están sometidos a una regulación exquisita.

La desregulación de los miRNAs ocasiona grandes alteraciones en los mecanismos celulares, y por ello afecta a numerosas enfermedades humanas, como el cáncer (32). Calin et al fueron los primeros en publicar, en el año 2002, la desregulación en el perfil de miRNAs existente en un tipo de cáncer. Concretamente, identificaron la delección del cluster miR-15a/16-1 en leucemia linfocítica crónica, la cual producía la sobreexpresión del factor

antiapoptótico BCL2, que es la diana de este cluster de miRNAs. Además, años más tarde estos mismos investigadores demostraron que más de la mitad de los miRNAs conocidos están localizados en regiones genómicas cuya alteración es frecuente en cánceres humanos (33). Hoy en día se conocen muchos miRNAs que están asociados al cáncer (“oncomirs”), y en función de cuál sea su diana se pueden clasificar en supresores tumorales, por reprimir la expresión de oncogenes, o en oncogénicos, por reprimir la de supresores tumorales (20).

Dado el gran impacto que se está viendo que tienen los miRNAs en la carcinogénesis, se cree que poseen un gran potencial en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas. La posibilidad de utilizar el conocimiento adquirido durante el desarrollo de las terapias con RNA pequeño de interferencia (siRNA) en los miRNAs sienta las bases para empezar a estudiar su posible aplicabilidad terapéutica. Además, el hecho de que sea posible sintetizar moléculas antagónicas de miRNAs (“antimiRs”), así como moléculas que los mimeticen (“miRNA mimetics”), permitiría tratar tanto la subexpresión como la sobreexpresión de miRNAs. Por último, la capacidad de los miRNAs de regular varios genes haría posible la intervención de varias vías de señalización con una única molécula (34), lo cual sin duda es muy interesante de cara al desarrollo de farmacoresistencias.

2. OBJETIVOS

1. Realizar una revisión de los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de melanoma y estudiar la implicación de los miRNAs en los mismos.
2. Investigar cuáles son los mecanismos que subyacen en la resistencia del melanoma frente a la terapia dirigida y buscar qué estrategias se están llevando a cabo para sortearla.
3. Estudiar la posibilidad de introducir los miRNAs en la terapéutica del melanoma.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica de estudios publicados en la base de datos “PubMed” (NCBI). Para acotar la búsqueda y realizarla de forma precisa se ha utilizado el buscador MeSH, empleando como palabras clave: “melanoma”, “microRNA”, “drug resistance” y “treatment”, combinadas entre sí mediante el operador booleano AND, fundamentalmente. Ciertas búsquedas se restringieron con el año de publicación (a partir de 2016) y únicamente revisiones, dada su elevada evidencia. También se han empleado Guías Clínicas de Hospitales y libros de texto sobre Patología. Asimismo, se han consultado webs institucionales de referencia, como la de la

OMS o la AEMPS, y de sociedades de oncología, como la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) o la American Society of Cancer (ASC). Por último, se realizó una búsqueda de ensayos clínicos en la base de datos del U.S. National Institutes of Health (NIH).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de melanoma. Papel de los miRNAs

Mueller et al fueron los primeros en estudiar las diferencias entre el miRNAoma de los melanocitos y de las líneas celulares de melanoma (35). Después de ellos, Caramuta et al, Chan et al y muchos otros, han descrito diferentes patrones de expresión de miRNAs, tanto en líneas celulares de melanoma, como en muestras clínicas de melanoma metastásico y de melanoma primario (36), (37). Tras años de estudio y comparación, a día de hoy se sabe que el patrón de expresión de miRNAs es diferente entre una célula melanocítica y una tumoral de melanoma, y además este último es diferente del de otros tipos tumorales. De esta forma, la determinación de ciertos miRNAs por técnicas de microarray y RT-PCR es capaz de diferenciar una célula normal melanocítica de una tumoral de melanoma con una exactitud del 100% (36). Además, ciertos miRNAs son característicos de determinados subtipos clínicos, y con ellos se puede diferenciar, por ejemplo, entre melanoma acral y no acral (37). De igual modo, existen miRNAs específicos involucrados en la etapa temprana de la enfermedad y en la etapa metastásica (34). Por último, también se ha visto que ciertos miRNAs están correlacionados con un buen pronóstico, y otros con malo (36).

La vía de señalización MAPK/ERK tiene un papel central en el fenotipo oncogénico y proliferativo de las células tumorales, y de hecho el 30% de los cánceres la tienen hiperactivada (38). En el melanoma, entre el 40 y el 60% de los pacientes portan la mutación BRAF V600, que da lugar a la hiperactivación de esta vía. Este hecho es el que ha llevado a los miRNAs, conocidos reguladores de varias vías asociadas al cáncer, a ser el centro del estudio de muchas investigaciones sobre la vía MAPK/ERK, a fin de determinar si están también involucrados en esta vía.

En el año 2017, Fattore et al publicaron que la mutación BRAF ejerce múltiples efectos reguladores de la melanogénesis, y que gran parte de ellos es a través de la inducción o represión de una compleja red de miRNAs cuyas dianas son responsables de la promoción o supresión del crecimiento del melanoma (16). El entramado total de miRNAs que afectan a la vía MAPK/ERK es inabarcable en este tipo de trabajo. Por esta razón, se ha decidido seleccionar un miRNA y sintetizar lo que se sabe de él, ya que sin lugar a dudas también es un

reflejo de la trascendencia global que tiene la desregulación de los miRNAs en el desarrollo del cáncer.

Liu et al (29) realizaron un screening de miRNAs mediante PCR array en líneas celulares Malme-3 (“wild-type” BRAF) y Malme-3M (BRAF V600E) en el que vieron que la expresión de tres miRNAs estaba significativamente disminuida. De entre esos tres, decidieron centrarse en miR-524-5p, que era el único que previamente no había sido relacionado con la vía MAPK/ERK.

En primer lugar, para ver si miR-524-5p guardaba relación o no con la vía MAPK/ERK, lo que hicieron fue sobreactivar la vía tratando células HEK-293 con factor de crecimiento epidérmico (EGF) o sobreexpresando la mutación de BRAF. El resultado fue que cuando la vía MAPK/ERK se encuentra hiperactivada, los niveles de miR-524-5p disminuyen (Ver Figura 3A). A continuación, trataron células SK-Mel-19 con iBRAF o iMEK para ver qué sucedía si, por el contrario, se inactivaba la vía. En estas circunstancias lo que se observó fue que los niveles de miR-524 aumentan (Ver Figura 3B). Por tanto, concluyeron que parece existir una relación inversa entre la activación de la vía MAPK/ERK y los niveles de expresión de miR-524-5p.

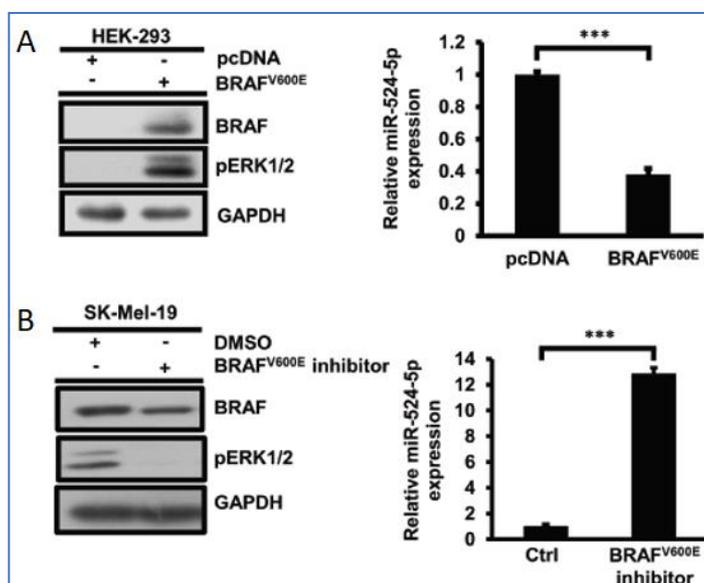


Figura 3. A. Over-expressing mutated V600E BRAF in HEK293 cells B. SK-Mel-19 cells treated with V600E BRAF inhibitor (29).

Más tarde, estos mismos investigadores demostraron que miR-524-5p es capaz de unirse directamente al extremo 3'UTR del mRNA de BRAF y de ERK2. Para ello construyeron vectores luciferasa que contenían el fragmento 3'UTR “wild-type” y vectores que lo contenían pero sin el sitio de unión de miR-524-5p. Lo que se observó fue que el

aumento en la concentración de miR-524-5p producía una disminución dosis-dependiente de la expresión de la luciferasa en el vector que contiene el “wild-type”, pero no en el mutante. A continuación vieron que esta interacción efectivamente tiene una importante repercusión en los niveles de expresión de BRAF y ERK2, para lo cual transfectaron a miR-524-5p y midieron los niveles de expresión de BRAF y ERK2.

Estos dos resultados, tomados en conjunto, indican que miR-524-5p es una diana de la vía MAPK/ERK, pero a su vez que miR-524-5p tiene la capacidad de inhibir dicha vía a través de la inhibición de BRAF y ERK2. Es decir, que parece existir un mecanismo regulador feedback entre la vía MAPK/ERK y miR-524-5p. Se decidió proponer un modelo que aunara estos nuevos conocimientos:

- A. **Vía MAPK/ERK normal:** cuando los niveles de expresión de miR-524-5p y la actividad de la vía MAPK/ERK se encuentran en equilibrio, las células mantienen un estado constante.
- B. **Activación BRAF V600E:** la hiperactivación constante de la vía MAPK/ERK disminuye la expresión de miR-524-5p, lo cual le inhabilita para poder inhibirla y la célula adquiere altas propiedades proliferativas y migratorias.
- C. **Tratamiento con miR-524-5p:** la sobreexpresión de un miR-524-5p mimético impide la expresión de BRAF y ERK2 e inhibe la actividad de la vía MAPK/ERK, dando como resultado una disminución de la proliferación y migración celular.

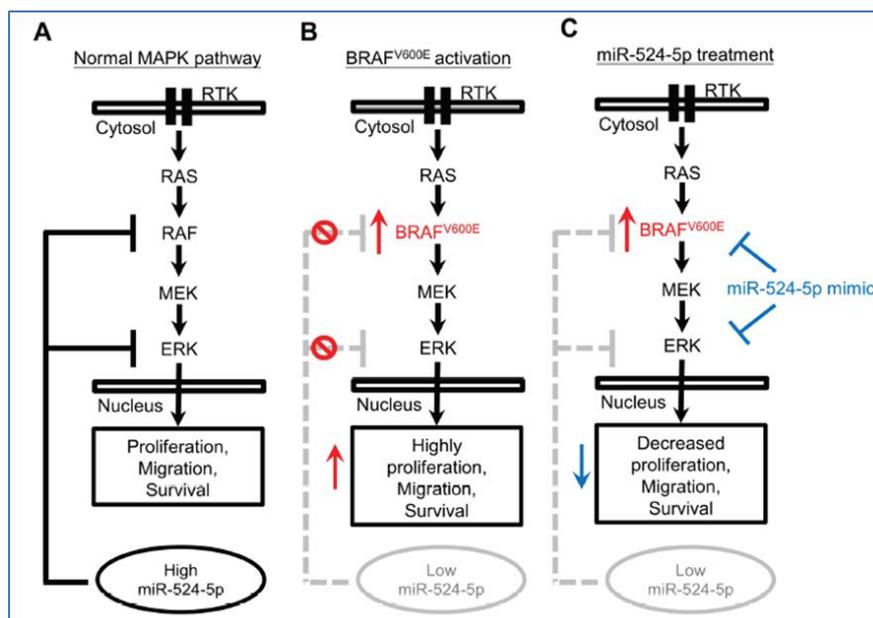


Figura 4. The model of miR-524-5p in MAPK/ERK signaling (29).

Además, vieron que miR-524-5p es capaz de disminuir el tamaño de los tumores *in vivo*. Para ello, inyectaron en ratones células SK-Mel-19 transfectadas con miR-524-5p, y después de 3 semanas midieron el tamaño de los tumores, así como la expresión del miRNA en el tumor y los niveles de BRAF y ERK2. Los ratones transfectados con el miRNA tenían altos niveles de expresión en el tejido tumoral y su tamaño de tumor, así como los niveles de BRAF y ERK2, eran considerablemente inferiores a los de los ratones control.

El miRNA 524-5p no es el único relacionado con la vía MAPK/ERK; de hecho se han descrito decenas. Sin embargo, la mayoría de los miRNAs definidos hasta la fecha tenían como dianas moléculas que aparecen más abajo en la vía de señalización. La importancia de este estudio es que fue el primero en identificar un miRNA que además de tener como diana una importante proteína de la vía MAPK/ERK (BRAF), regulaba un segundo componente también muy importante de la vía (ERK2). También es interesante señalar que tanto este estudio como muchos otros han llegado a la conclusión de que cuando la vía MAPK/ERK está activada, lo que predomina es la supresión de la expresión de miRNAs. Es decir, que los miRNAs poseen en general un papel oncosupresor. Por último, aún queda la incógnita de cómo la vía MAPK/ERK es capaz de influenciar la expresión de miR-524-5p. La respuesta más probable es que lo hace a través de factores de transcripción que dependen de ella, como Myc (39), que reprime la expresión de múltiples miRNAs y cuya expresión está regulada a su vez por otros miRNAs (20).

Numerosos miRNAs han entrado en ensayos clínicos de cáncer (40), pero actualmente no hay ninguno para melanoma. Los resultados de este estudio indican que miR-524-5p tiene un papel regulador negativo muy importante de la vía MAPK/ERK, y por tanto un gran potencial terapéutico en melanoma BRAF V600E. Dado que hoy en día se sabe que se desarrollan farmacorresistencias en prácticamente todos los pacientes tratados con terapia dirigida, se están buscando nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, los miRNAs, al suprimir varios mRNAs y por tanto tener múltiples dianas, podrían no dar lugar al feedback que genera la inhibición de una única diana, y que promueve la generación de resistencias.

4.2. Resistencias frente a la terapia dirigida y estrategias para sorteralas

La farmacorresistencia o resistencia a fármacos es la reducción de la efectividad de antimicrobianos, antihelmínticos o antineoplásicos en el tratamiento de enfermedades (41). Puede ser de dos tipos: intrínseca, en la que el paciente no ha respondido en ningún momento a la terapia, o adquirida, en la cual el paciente inicialmente responde a la terapia, pero tiempo después progresa. En el caso de la terapia dirigida frente a melanoma metastásico BRAF

V600E, la resistencia intrínseca frente a iBRAF ocurre en menos del 10% de los pacientes (42). Sin embargo, la resistencia adquirida aparece en prácticamente todos los pacientes tratados, y en la mayoría durante el primer año de tratamiento (43). Por otro lado, también se ha descrito una resistencia similar en cuanto a tiempos frente a iMEK, la cual en ensayos clínicos apareció en el 70% de los pacientes tratados en monoterapia con uno de estos inhibidores (43). Además, y más preocupante, se ha reportado que el 80% de los pacientes que desarrollaron resistencia frente a los iBRAF, también la tenían para los iMEK, lo cual hace sospechar de la existencia de mecanismos de resistencia cruzados (44).

Las células tumorales desarrollan numerosos mecanismos para resistir a los fármacos que inhiben la vía MAPK/ERK. Un estudio que examinó 100 muestras procedentes de pacientes que habían progresado a un iBRAF en monoterapia reveló que en el 70-80% de los casos se produjo una reactivación de la vía MAPK/ERK (45). Esta puede tener lugar por los siguientes mecanismos (10):

- **Alteraciones específicas en BRAF:** por un lado, se puede producir amplificación del gen BRAF mutado, la cual conduce a una hiperseñalización de la vía MAPK/ERK. Esta alteración está presente en el 8-30% de los pacientes con resistencia a iBRAF (45). Por otro lado, también se pueden ocasionar empalmes alternativos (alternative splicing), que incrementan su tendencia a homodimerizar. En consecuencia, BRAF continua participando en la señalización de la vía (46).
- **Sobreexpresión de MAP3K alternativas:** además de BRAF, se ha visto que las células tumorales son capaces de utilizar otras tres isoformas de RAF para activar la vía MAPK/ERK y así sortear a los iBRAF. Concretamente, las células de melanoma BRAF V600E resistentes tienen elevados niveles de CRAF, ARAF y COT (cancer Osaka thyroid), las cuales son capaces de reactivar la señalización de la vía MAPK/ERK (10).
- **Mutaciones que activan la vía MAPK/ERK:** el 30% de los melanomas BRAF mutados con resistencia adquirida a iBRAF presentan mutaciones en NRAS (45). Estas disminuyen su actividad GTPasa intrínseca e inducen la vía MAPK/ERK a través de la activación de CRAF (47). También se ha visto que el 9% de los melanomas tienen mutaciones en RAC1 (48). Por último, el 7% de los melanomas resistentes a inhibidores de BRAF presentan mutaciones en MEK1 y MEK2, que suelen conducir a una mayor actividad quinasa independiente de RAF (49).

La respuesta de los pacientes con melanoma BRAF mutado a la monoterapia con iBRAF o iMEK es muy breve, ya que en la mayoría de los casos aparecen resistencias y los pacientes progresan (10). A pesar de que en algunos pacientes continuar con la terapia una vez instaurada la resistencia puede tener algún beneficio clínico (50), claramente lo deseable sería poder acabar con la resistencia, o prevenir su aparición.

Hoy en día se está trabajando en dos direcciones para tratar de vencer o prevenir las resistencias. Por un lado, Das Thakur et al han visto que el tratamiento de forma intermitente con iBRAF es más efectivo en ratones con melanoma resistente a iBRAF que la terapia continuada (51). Además, se cree que la administración intermitente también podría prevenir la aparición de resistencia manteniendo el control del tumor (52). Por otro lado, también se está trabajando con varias terapias combinadas con el fin de que atacando varias dianas o vías de señalización se puedan lograr respuestas más duraderas (10):

- **Combinación de iBRAF e iMEK:** la constatación de que las células de melanoma mutadas en BRAF poseen una sensibilidad mayor a la inhibición de MEK en comparación con líneas celulares “wild-type” o mutantes RAS fue la que motivó el estudio de esta terapia combinada (10). Además, más tarde se vio que la adición de un iMEK al tratamiento con iBRAF era capaz de acabar con la resistencia a la monoterapia (53), y que la administración concomitante de ambos desde el inicio impedía la aparición de resistencias por reactivación de la vía MAPK/ERK (54). A raíz de estos hechos, se realizaron varios ensayos clínicos en fase 3 en los que se compararon diferentes combinaciones de iBRAF e iMEK frente a la monoterapia con iBRAF. Los resultados fueron que la terapia combinada presenta mayores respuestas, mejora tanto la SG como la SLP y da lugar a menor toxicidad cutánea (54). Actualmente la combinación de un iBRAF y un iMEK es la terapia de elección en melanoma metastásico BRAF V600E.
- **Combinación de inhibidores de PI3K/AKT e inhibidores de MAPK/ERK:** la inhibición de BRAF mutado y de la vía PI3K/AKT tiene efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis en líneas celulares de melanoma BRAF mutado (55). Además, se piensa que la vía de AKT puede contribuir al desarrollo de ciertas resistencias frente a terapia combinada de un iBRAF y un iMEK, por lo que la adición de un inhibidor de PI3K/AKT podría impedir su aparición. Los ensayos preclínicos con la triple terapia dieron buenos resultados, y hoy en día existen varios ensayos clínicos en fase 1.

- **Combinación de iBRAF/iMEK e inmunoterapia:** los inhibidores de CTLA-4 y PD-1 dan lugar a respuestas duraderas y prolongan la supervivencia de los pacientes con melanoma (10). Actualmente se cuenta con numerosos datos de laboratorio y translacionales que apuntan al incremento de la actividad antitumoral y al no solapamiento de la toxicidad entre la terapia dirigida y la inmunoterapia (56), y por ello existe un creciente interés por combinar estas terapias. Aunque algunos estudios indican que los iMEK podrían inhibir a los linfocitos T, se sabe que los iBRAF no comprometen su actividad, y de hecho promueven la infiltración y la citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ y disminuyen la expresión de moléculas inmunosupresoras, como IL-6 o IL-8. Por lo tanto, cabe esperar que la combinación de iBRAF e inmunoterapia produzca importantes beneficios clínicos (57). En la actualidad hay en marcha ensayos clínicos en fase 3.

Sin embargo, a pesar de los alentadores resultados que se obtuvieron con los ensayos clínicos de la terapia combinada de iBRAF e iMEK, más tarde se ha visto que aproximadamente el 50% de los pacientes desarrollan resistencias y progresan a los 12 meses (10). La reactivación de la vía MAPK/ERK sigue siendo el mecanismo predominante de resistencia. Además, se vio que la reactivación de la vía MAPK/ERK podía dar lugar al desarrollo de neoplasias cutáneas secundarias debido al bloqueo de la vía en células no mutadas en BRAF.

La conclusión que se puede extraer es que la terapia combinada falla si mutaciones singulares confieren resistencia cruzada (58). Por lo tanto, las nuevas estrategias terapéuticas probablemente vayan a requerir una combinación más compleja de fármacos que vayan dirigidos frente a varias vías de señalización independientes, además de MAPK/ERK y PI3K/AKT, y que no tengan efectores de resistencia comunes (10).

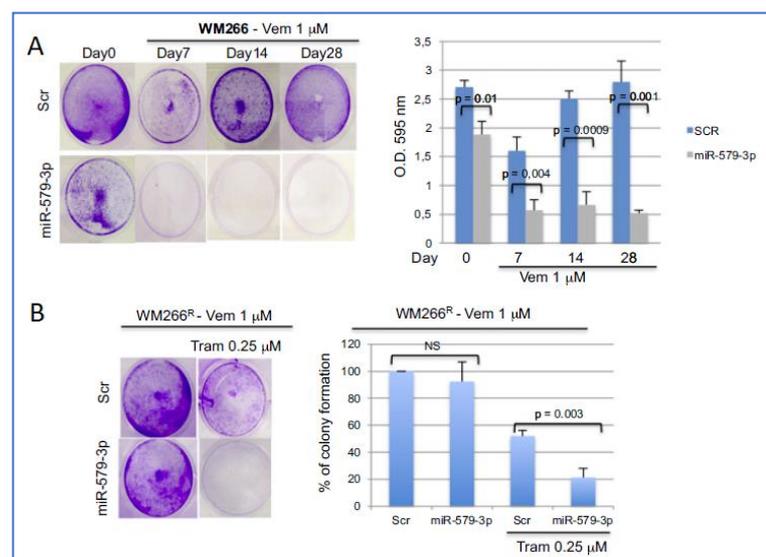
4.3. miRNAs en la terapéutica del melanoma

Dado que tratar de vencer la reactivación de la vía MAPK/ERK dirigiendo la terapia contra dos dianas en vez de una tampoco ha resultado exitoso, empieza a ser necesario el estudio de otros mecanismos de resistencia relacionados no tanto con la mutación, sino con la reprogramación de la dinámica de las vías de señalización. Además, en el 26% de las muestras analizadas no es posible detectar ninguna mutación (45), lo cual indica que hay cambios epigenéticos o postranscripcionales que son responsables completamente de parte de las resistencias (59).

Un análisis de muestras de melanoma y melanocitos mediante microarray reveló que existen 420 miRNAs controlados por la vía de señalización MAPK/ERK (60). A medida que se fueron identificando, los miRNAs se clasificaron en oncosupresores o tumorigénicos, generado así una visión general de su función en el desarrollo de melanoma. Sin embargo, hasta el año 2016 nadie se preguntó si los miRNAs podían tener algún papel en el desarrollo de resistencias frente a la terapia dirigida. Ese año, Fattore et al identificaron a miR-579-3p, un miRNA oncosupresor cuya subregulación está relacionada con la progresión del melanoma metastásico, ya que bajos niveles de expresión de miR-579-3p se correlacionan con baja supervivencia y estos se van reduciendo a medida que la enfermedad avanza (59). No obstante, la aportación más interesante de estos investigadores fue el establecimiento de la relación entre miR-579-3p y el desarrollo de resistencias a la terapia dirigida en melanoma BRAF mutado.

Fattore et al vieron que existe una diferencia muy significativa entre los niveles de miR-579-3p tanto en líneas celulares resistentes como en muestras de pacientes una vez tratados con inhibidores de quinasa, y líneas celulares sensibles o muestras tumorales de pacientes sin tratar, siendo mucho menores en el primer caso. La relación fue consolidada con la realización de ensayos clonogénicos en líneas celulares WM266, que probaron cómo la sobreexpresión de miR-579-3p es capaz de impedir el desarrollo de resistencias a vemurafenib (iBRAF) (Ver Figura 5A). También vieron que dicha sobreexpresión es capaz de potenciar la inhibición por trametinib (iMEK) en células de melanoma iBRAF-resistentes (WM266^R) (Ver Figura 5B):

Figura 5. miR579-3p potentiates melanoma cell growth inhibition induced by BRAFi and MEKi and impairs the establishment of drug resistance (A) and reverts drug resistance (B) (59).



Por otro lado, Fattore et al también descubrieron que miR-579-3p es capaz de afectar simultáneamente dos vías requeridas por las células de melanoma BRAF mutadas para proliferar: BRAF/MAPK y MDM2/p53, y se piensa que su gran capacidad para producir arresto celular y apoptosis es debida precisamente a su interferencia con ambas.

Una vez obtenidos estos resultados, decidieron crear un modelo que los aunara:

1. **Melanocitos normales:** la elevada expresión de miR-579-3p regula y mantiene los niveles de BRAF y MDM2, y con ello controla la proliferación celular.
2. **Células de melanoma BRAF mutado sensibles:** los niveles de miR-579-3p se encuentran disminuidos y esto permite el crecimiento de las células de melanoma por la pérdida del feedback negativo, que conduce a una elevación de los niveles de BRAF y MDM2.
3. **Células de melanoma BRAF mutado resistentes:** los niveles de miR-579-3p están aún más disminuidos, y esto da lugar a la pérdida completa del feedback negativo, que da lugar a mayores niveles de BRAF y MDM2. En consecuencia, se produce un crecimiento celular completamente descontrolado y un aumento de la migración celular y metástasis.

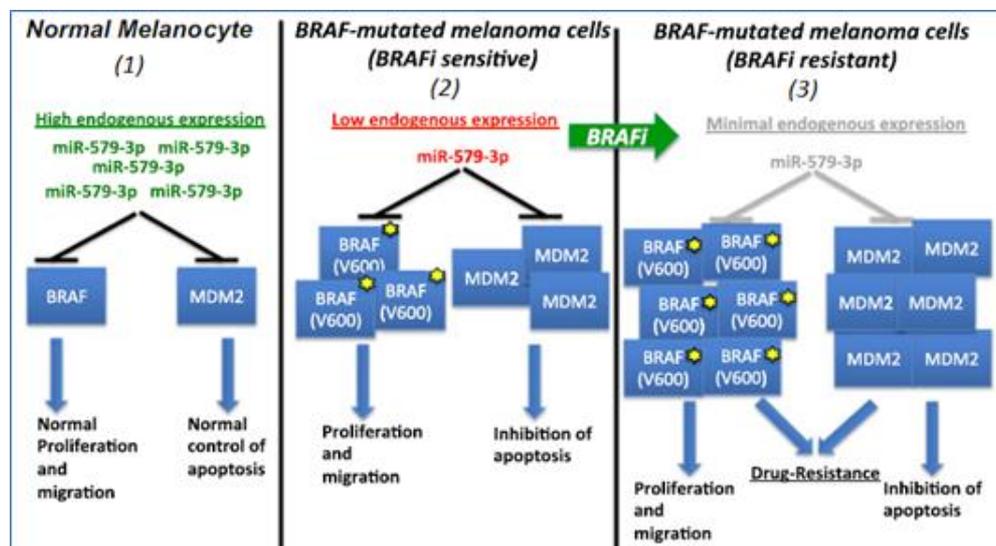


Figura 6. miR-579-3p is down-regulated in melanoma patients who developed resistance to target therapies (59).

Por último, faltaría por determinar el mecanismo de control de los niveles de expresión de miR-579-3p, y cómo este es modificado durante el desarrollo de melanoma y de la resistencia a la terapia dirigida. A fecha de hoy, todo apunta a que miR-579-3p está regulado por factores

de transcripción cuya expresión está alterada durante el desarrollo de las resistencias (59). En este sentido, el factor de transcripción MITF, un importante regulador del desarrollo de melanoma, puede jugar un papel clave (59). Estudios recientes han correlacionado la pérdida de la expresión de MITF con el desarrollo de las resistencias (61). miR-579-3p es un miRNA intrónico y se encuentra localizado en el intron 11 del gen humano ZFR, por lo que probablemente sea coexpresado con su gen hospedador (62). Lo que une estos hechos es que parece que ZFR es diana de MITF, ya que su promotor tiene sitios de unión para él. Teniendo esto en cuenta, se baraja la hipótesis de que la subregulación de MITF durante el desarrollo de la resistencia sea responsable de la disminución en la expresión de miR-579-3p (59).

Por tanto, el potencial terapéutico de miR-579-3p tiene dos vertientes. La primera, como tratamiento per sé, no parece que vaya a tener mucha relevancia clínica, ya que a pesar de su papel oncosupresor, su sobreexpresión tiene un efecto moderado en el crecimiento celular. Sin embargo, su otra vertiente como complemento de la terapia combinada podría dar lugar a un control más prolongado de la enfermedad debido a su capacidad para impedir el desarrollo de resistencias, y esto sí podría ofrecer resultados estadística y clínicamente significativos en los pacientes con melanoma BRAF mutado.

Por último, señalar que miR-579-3p también podría ser utilizado como biomarcador en sangre para predecir la respuesta a la terapia o el desarrollo de resistencias (63), ya que los miRNAs son muy estables en plasma porque viajan empaquetados en exosomas o asociados a RNA-binding proteins, que previenen su degradación (64).

5. CONCLUSIONES

1. La desregulación de la vía MAPK/ERK en melanoma ocasiona alteraciones en el perfil de expresión de miRNAs, y viceversa, y cuando se restablece el patrón normal de expresión se produce una regresión en el fenotipo maligno.
2. El 50% de los pacientes tratados con terapia dirigida combinada, la estrategia terapéutica que se utiliza en la actualidad en melanoma metastásico BRAF mutado, continúan desarrollando farmacorresistencias, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas combinaciones que venzan o eviten la aparición de las mismas.
3. La recuperación del perfil de miRNAs mediante moléculas miméticas potencia el efecto inhibitorio de la vía MAPK/ERK con la terapia dirigida (tanto monoterapia como terapia combinada) y podría impedir el desarrollo de farmacorresistencias.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. D. Strayer ER. Fundamentos clinicopatológicos en medicina. 7ª. D. Strayer, E. Rubin, J. Saffitz AS, editor. Barcelona: Wolters Kluwer; 2017. 1255-1264 p.
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Melanoma [Internet]. [cited 2018 Mar 26]. Available from: <https://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/melanoma?showall=1>
3. G. Casado, E. Espinosa AH. Módulo 1: Melanoma. In: Curso Online de Formación en Oncohematología. Grupo Farmacia Oncológica de la SEFH;
4. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009;20;27(36):
5. Society AC. Etapas del cáncer de piel tipo melanoma [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 26]. Available from: <https://www.cancer.org/>
6. D. Goit, J. Thomson et al. Melanoma. In: Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN). Version 2. National Comprehensive Cancer Network; 2018.
7. Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA ND, Suman VJ, Moon J, Sondak VK, Atkins MB E, EA, Parulekar W, Markovic SN SS et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. J Clin Oncol. 2008;26:527-34.
8. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML SS. Phase III multicenter randomized trial of the Darmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol. 1999;17(9):2745-51.
9. M.F. Avril, S. Aamdal, J.J. Grob, A. Hauschild PM. Fotemustine Compared With Dacarbazine in Patients With Disseminated Malignant Melanoma:A Phase III Study. J Clin Oncol. 2004;22:1118-25.
10. Lim SY, Menzies AM, Rizos H. Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. Cancer. 2017;123:2118-29.
11. Fernández EÉ. BRAF. ¿Qué opciones terapéuticas podemos ofrecer a estos pacientes? In: Revisiones en cáncer. 32nd ed. Madrid; 2018. p. 122-3.
12. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417:949-54.
13. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ SE, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A M, FM MN. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. J Transl Med. 2012;10:85.
14. López PB. Inmunología y cáncer. El porqué de la inmunoterapia. In: Revisiones en cáncer. 32nd ed. 2018. p. 81.
15. Lacroix M. Targeted Therapies in Cancer. Publishers NS, editor. Hauppauge , NY; 2014.
16. Fattore L, Costantini S, Malpicci D, Ruggiero CF, Ascierto PA, Croce CM, et al. MicroRNAs in melanoma development and resistance to target therapy. Oncotarget [Internet]. 2017;8(13):22262-78. Available from: <http://www.oncotarget.com/abstract/14763>
17. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB A, P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A MM, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011;364:2507-16.
18. RS. L. Combinatorial therapies to overcome B-RAF inhibitor resistance in melanomas. Pharmacogenomics. 2012;13:125-8.
19. Bertone, P.; Stolc, V.; Royce, T.E.; Rozowsky, J.S.; Urban, A.E.; Zhu, X.; Rinn, J.L.; Tongprasit, W.; Samanta, M.; Weissman S. et al. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. Science (80-). 2004;306:2242-6.
20. Deng G, Sui G. Noncoding RNA in oncogenesis: A new era of identifying key players. Int J Mol Sci. 2013;14(9):18319-49.
21. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet. 2011;12:861-74.
22. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004;5(7):522-31.
23. Calin GA CC. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006;6:857-66.
24. Hayes J, Peruzzi PP LS. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. Trends Mol Med. 2014;20:460-9.
25. Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2015;120:15-20.
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. the C. elegans\rheterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense\rcomplementarity to lin-14. Cell . 1993;75: 843-85:843-54.
27. Wilczynska A BM. The complexity of miRNA mediated repression. Cell Death Differ. 2015;22:22-33.
28. Krek, A.; Grun, D.; Poy, M.N.; Wolf, R.; Rosenberg, L.; Epstein, E.J.; MacMenamin, P.; da Piedade, I.; Gunsalus, K.C.; Stoffel M. et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet. 2005;37:495-500.
29. Liu S-M, Lu J, Lee H-C, Chung F-H, Ma N. miR-524-5p suppresses the growth of oncogenic BRAF melanoma by targeting BRAF and ERK2. Oncotarget [Internet]. 2014;5(19):9444-59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4253445&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Ramalingam P, Palanichamy JK, Singh A, Das P B, M, Kassab MA, Sinha S CP. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. RNA. 2014;20:76-87.
31. Ha M KV. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15:509-24.
32. Jansson MD LA. MicroRNA and cancer. Mol Oncol. 2012;6:590-610.
33. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S N, E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L K, T NM et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:15524-9.
34. Mueller DW, Bosserhoff AK. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. Br J Cancer [Internet]. 2009;101(4):551-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605204>
35. Mueller DW, Rehli M BA. No TitlemiRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and

- progression of malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2009;129(1740–51).
36. Caramuta S, Egyházi S, Rodolfo M, Witten D H, J, Larsson C LW. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2010;130:2062–70.
 37. Chan E, Patel R, Nallur S, Ratner E, Bacchiocchi A H, K, Szpakowski S, Godshalk S, Ariyan S, Sznol M H, R, Krauthammer M TD et al. MicroRNA signatures differentiate melanoma subtypes. *Cell Cycle.* 2011;10:1845–52.
 38. J. MC and S. Targeting the RAF-MEK/ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2009;283(2):125–34.
 39. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE W, KM, Dang CV T-TA and MJ. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.* 2008;40(1):43–50.
 40. Ling H FM and CG. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(11):847–65.
 41. MeSH Browser [Internet]. [cited 2018 Apr 7]. Available from: [https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Drug Resistance](https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Drug%20Resistance)
 42. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:809–19.
 43. Chan M, Haydu L, Menzies AM et al. Clinical characteristics and survival of BRAF-mutant (BRAF plus) metastatic melanoma patients (pts) treated with BRAF inhibitor (BRAFi) dabrafenib or vemurafenib beyond disease progression (PD). *J Clin Oncol.* 2013;21 (suppl):9062.
 44. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC et al. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol.* 2013;31:482–9.
 45. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res.* 2014;20:1965–77.
 46. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature.* 2011;480:387–90.
 47. Sondergaard JN, Nazarian R, Wang Q et al. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med.* 2010;8:39.
 48. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012;44:1006–14.
 49. Johnson DB, Menzies AM, Zimmer L et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: a multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer.* 2015;51:2792–9.
 50. Carlino MS, Gowrishankar K, Saunders CA et al. Antiproliferative effects of continued mitogen-activated protein kinase pathway inhibition following acquired resistance to BRAF and/or MEK inhibition in melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2013;12:1332–42.
 51. Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature.* 2013;494:251–5.
 52. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F et al. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:455–67.
 53. Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer.* 2010;102:1724–30.
 54. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371:1867–76.
 55. Sanchez-Hernandez I, Baquero P, Calleros L et al. Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/AKT/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK independent mechanism. *Cancer Lett.* 2012;314:244–55.
 56. Szczepaniak Sloane R, Gopalakrishnan V, Reddy SM ZX. Interaction of molecular alterations with immune response in melanoma. *Cancer.* 2017;123:2130–42.
 57. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19:1225–31.
 58. Bozic I, Reiter JG, Allen B et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife.* 2013;2:e00747.
 59. Fattore L, Mancini R, Acunzo M, Romano G, Laganà A, Pisanu ME, et al. miR-579-3p controls melanoma progression and resistance to target therapy. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2016;113(34):E5005–13. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1607753113>
 60. Coutts KL, Anderson EM, Gross MM, Sullivan K AN. Oncogenic B-Raf signaling in melanoma cells controls a network of microRNAs with combinatorial functions. *Oncogene.* 2013;32:1959–70.
 61. Ji Z et al. MITF modulates therapeutic resistance through EGFR signaling. *J Invest Dermatol.* 2015;135(7):1863–72.
 62. Hinske LC et al. Alternative polyadenylation allows differential negative feedback of human miRNA miR-579 on its host gene ZFR. *PLoS One.* 2015;10(3).
 63. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA PK. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(3):145–56.
 64. Mitchell, P.S.; Parkin, R.K.; Kroh, E.M.; Fritz, B.R.; Wyman, S.K.; Pogosova-Agadjanyan, E.L.; Peterson, A.; Noteboom, J.; O'Briant, K.C.; Allen A. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:10513–8.