



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**ÚLTIMOS AVANCES EN EL DISEÑO DE
FÁRMACOS DIRIGIDOS A INTERRUMPIR EL
CRECIMIENTO Y PROGRESIÓN DEL
MELANOMA**

Autor: Sergio Maganto Garrido

Fecha: Junio 2020

Tutor: Carmen Pedregal Freire

ÍNDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1.1 Diagnóstico y estadificación del melanoma	3
1.2 Opciones de tratamiento estándar del melanoma	5
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGÍA.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4.1 Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del melanoma	6
4.2 Terapia dirigida.....	7
4.2.1 Inhibidores de BRAF	7
4.2.2 Inhibidores de MEK.....	9
4.2.3 Terapia combinada: inhibidores de BRAF + inhibidores de MEK.....	10
4.2.4 Inhibidores de c-KIT	11
4.2.5 Futuras direcciones en terapia dirigida	11
4.3 Inmunoterapia	12
4.3.1 Puntos de control inmunitario	13
4.3.2 Fármacos anti-CTLA-4	13
4.3.3 Fármacos anti-PD-1/PD-L1	14
4.3.4 Terapia combinada: anti-CTLA-4 + anti PD-1 / Inmunoterapia + terapia dirigida	15
4.3.5 Viroterapia oncolítica.....	15
4.3.6 Futuras direcciones en inmunoterapia.....	16
4.4 Algoritmo de tratamiento	17
5. CONCLUSIONES.....	17
6. BIBLIOGRAFÍA.....	18

RESUMEN

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, células que producen el pigmento melanina, responsable de la coloración de la piel. Es la forma más agresiva de cáncer de piel, debido a su elevado potencial metastásico y a sus altas tasas de mortalidad. Su patogenia depende de mutaciones del ADN que conducen a la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumor. Los enfoques terapéuticos actuales incluyen resección quirúrgica, quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida.

La identificación de regulaciones erróneas en vías de transducción de señales intracelulares ha brindado una oportunidad para desarrollar inhibidores específicos de mutaciones, que se dirigen específicamente a las cascadas de señalización mutadas.

En los últimos años, los ensayos clínicos con inhibidores de la vía MAPK y los inhibidores de punto de control inmunitario han mostrado una mejora clínica significativa en el melanoma. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos puede disminuir debido al desarrollo de diversos mecanismos de resistencia.

En la presente revisión bibliográfica se ofrece una visión general de las novedosas opciones terapéuticas disponibles en la actualidad, que se encuadran en dos modalidades: la terapia dirigida (inhibidores de BRAF y MEK) y la inmunoterapia (anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1, viroterapia oncolítica), así como los últimos avances en el diseño de fármacos que se dirigen a múltiples vías moleculares tanto en melanoma preclínico como clínico.

Palabras clave: melanoma, tratamiento, terapia dirigida, inmunoterapia.

ABSTRACT

Melanoma is a malignant tumour of melanocytes, cells that produce the pigment melanin, responsible for skin colour. It is the most aggressive type of skin cancer, due to its high metastatic potential and its high mortality rate. Its pathogenesis depends on DNA mutations leading either to the activation of oncogenes or to the inactivation of suppressor genes. Current therapeutic approaches include surgical resection, chemotherapy, immunotherapy and targeted therapy.

The identification of misregulations in intracellular signal transduction pathways has provided an opportunity for the development of mutation-specific inhibitors, which specifically target the mutated signaling cascades.

Over the last years, clinical trials with MAPK pathway inhibitors and immune checkpoint inhibitors have shown a significant clinical improvement in melanoma. Despite the efficacy of these new therapies, tumours can develop resistance to the treatment.

The aim of this literature review is to offer a general overview of the novel therapeutic options available. There are two main strategies: targeted therapy (BRAF/MEK inhibitors) and immunotherapy (anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1, oncolytic virotherapy). The latest research has offered an important development in the design of new drugs targeting multiple molecular pathways to treat melanoma in different stages.

Keywords: melanoma, treatment, targeted therapy, immunotherapy.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El melanoma es una neoplasia maligna con elevada agresividad que representa la principal causa de muerte por cáncer cutáneo¹. El melanoma representa el 5% de todos los tumores malignos de la piel, aunque es responsable del 80% de las muertes por este tipo de tumores.

En los hombres, el melanoma se encuentra con frecuencia en el tronco (área desde los hombros hasta las caderas) o en la cabeza y el cuello. En las mujeres, el melanoma se forma con más frecuencia en los brazos y las piernas. Con menor frecuencia (5%), pueden desarrollarse en mucosas (oral, digestiva, genital), retina o meninges. Un 3% de los pacientes desarrolla melanomas ocultos (enfermedad metastásica sin evidencia de tumor primario)².

En los últimos años ha existido un crecimiento exponencial de los casos de melanoma debido a la combinación de factores ambientales y socio-culturales. En España, se esperan un total de 6179 casos nuevos (2507 en hombres y 3672 en mujeres) de melanoma para el año 2020¹, con una incidencia aproximada de 10 casos por cada 100.000 habitantes.

Los factores epidemiológicos y de riesgo que se han visto asociados al melanoma son los siguientes:

1.- Edad: El melanoma puede aparecer a cualquier edad. Aunque cada vez se diagnostican en gente más joven, la mayor frecuencia se concentra en la edad media de la vida. El 41% de los melanomas se diagnostican antes de los 55 años¹.

2.- Sexo: El melanoma es ligeramente más frecuente en las mujeres, donde predomina en extremidades inferiores y zonas de mayor exposición al sol; y en general, tiene mejor pronóstico que en los varones¹.

3.- Exposición solar: La exposición frecuente e intensa a la radiación ultravioleta es el principal factor de riesgo para el desarrollo del melanoma. Se cree que las propiedades genotóxicas, inflamatorias e inmunosupresoras de la radiación UV contribuyen conjuntamente a la iniciación, progresión y metástasis del melanoma³⁻⁴.

4.- Presencia de *nevus* (lunares): Los lunares son tumores pigmentados benignos de la piel. La presencia de *nevus* displásicos o atípicos (lunares con características distintas a las de un lunar común en cuanto a su tamaño, forma y color) confiere un mayor riesgo de desarrollar melanoma. A mayor número de *nevus*, sobre todo si son de gran tamaño y presentes desde el nacimiento (congénitos), se incrementa el riesgo de padecer melanoma⁽⁵⁻⁸⁾.

5.- Factores Genéticos: Entre el 6 y el 14 % de los casos de melanoma aparecen en individuos con historia familiar de melanoma, pero no todos se consideran melanomas hereditarios. En la actualidad se conocen 2 genes de susceptibilidad para el melanoma: el gen CDKN2A (p16), un gen supresor de tumor localizado en el cromosoma 9; y el CDK4, un oncogen localizado en el cromosoma 14. El 20-40 % de familias con melanoma presentan mutaciones en CDKN2A⁽⁹⁻¹¹⁾.

6.- Factor racial: El fototipo de la piel es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar un melanoma. Las razas de piel clara (fototipo bajo) tienen un riesgo mucho mayor que las de piel oscura. Esto se debe a que las personas de piel más oscura producen más melanina, pigmento que protege a la piel del daño de la radiación ultravioleta¹².

1.1 Diagnóstico y estadificación del melanoma

El diagnóstico clínico del melanoma se basa en el reconocimiento de las características clínicas de las formas de melanoma. Se estima que en el 20-40% de los casos, el melanoma procede de la transformación de un *nevus* preexistente, mientras que en el 60-80% restante el melanoma aparece *de novo*⁴.

Por ello, es importante saber reconocer cuando un lunar preexistente ha podido transformarse en un melanoma, para acudir lo más rápido posible al dermatólogo en busca de un diagnóstico preciso y precoz. Es de gran utilidad la regla **ABCDE**, la cual nos puede ayudar a distinguir un lunar normal de un melanoma.



Figura 1. Regla ABCDE para el diagnóstico del melanoma (tomado de AECC).

Para obtener un diagnóstico definitivo debe hacerse una biopsia, preferiblemente por escisión local, de cualquier lesión sospechosa. Las lesiones sospechosas nunca se deben rasurar ni cauterizar, ya que interfiere con la evaluación patológica de la profundidad de la lesión.

Determinar en qué fase o estadio se encuentra un tumor nos permite conocer la extensión de dicho tumor, tanto a nivel local como a distancia, para determinar el tratamiento más adecuado en cada caso. Los diferentes estadios para definir el melanoma cutáneo se agrupan en la clasificación TNM (tumor, ganglio linfático y metástasis, elaborada por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*¹³.

Tabla 1 y 2. Definiciones y estadiaje clínico del *American Joint Committee on Cancer*¹³ (8ª edición).

Tis		Melanoma in situ		ESTADIFICACIÓN DEL MELANOMA. CLASIFICACIÓN DEL AJCC	
T0	No hay evidencia de tumor primario (origen desconocido o el tumor ha regresado completamente)			Estadio 0	Tis, N0, M0
T1	Tumor que invade en profundidad menos de 1 mm con o sin ulceración			Estadio I	
T2	Tumor que invade entre 1 y 2 mm con o sin ulceración			Estadio IA	T1a, N0, M0
T3	Tumor que penetra en profundidad entre 2 y 4 mm con o sin ulceración de la piel			Estadio IB	T1b, N0, M0
T4	Tumor que penetra en profundidad más de 4 mm con o sin ulceración de la piel				T2a N0, M0
Existencia o no de adenopatías (N)				Estadio II	
N0	No adenopatías afectas			Estadio IIA	T2b N0, M0
N1	Afectación de un ganglio y/o lesiones satélites				T3a N0, M0
N2	Dos- 3 adenopatías afectas y/o lesiones satélites			Estadio IIB	T3b N0, M0
N3	4 o más adenopatías afectas y/o lesiones satélites				T4a N0, M0
En cuanto a la presencia o no de metástasis (M)				Estadio IIC	T4b N0, M0
M0	No hay evidencia de metástasis a distancia			Estadio III	Cualquier T, N1-3, M0
M1	M1a: Metástasis en la piel, músculo o adenopatías alejadas de la lesión primaria.			Estadio IV	Cualquier T, cualquier N, M1
	M1b: Metástasis en pulmón con o sin metástasis en zonas M1a.				
	M1c: metástasis en otros órganos distintos a los anteriores (excluyendo sistema nervioso central) con o sin metástasis en M1a o M1b.				
	M1d: Metástasis al Sistema Nervioso central con o sin metástasis en M1a, M1b o M1c.				

1.2 Opciones de tratamiento estándar del melanoma

El diagnóstico precoz es esencial para la curación del melanoma. En cuanto al tratamiento vamos a hablar de 3 opciones (tabla 3): la quirúrgica, tratamiento adyuvante y tratamiento del melanoma metastásico.

Tabla 3. Tratamiento estándar del melanoma (adaptado de *National Cancer Institute*).

Estadio (criterios de estadificación TNM)	Opciones de tratamiento estándar
Melanoma en estadio 0	Escisión
Melanoma en estadio I	Escisión con o sin tratamiento ganglionar
Melanoma en estadio II	Escisión con o sin tratamiento ganglionar
Melanoma en estadio III resecable	Escisión con o sin tratamiento ganglionar Terapia adyuvante
Melanoma en estadio III irresecable, en estadio IV y recidivante	Terapia intralesional Inmunoterapia Inhibidores de la transducción de señales Quimioterapia

2011 representa un punto de inflexión en la historia del tratamiento del melanoma. Hasta este año, en el que surgieron nuevos fármacos (fig.2), sólo se disponía de cinco tratamientos aprobados por la FDA: la hidroxiurea, los agentes alquilantes dacarbazina y temozolomida y las citoquinas interferon (IFN) α -2b e interleucina-2 (IL-2)¹⁴.

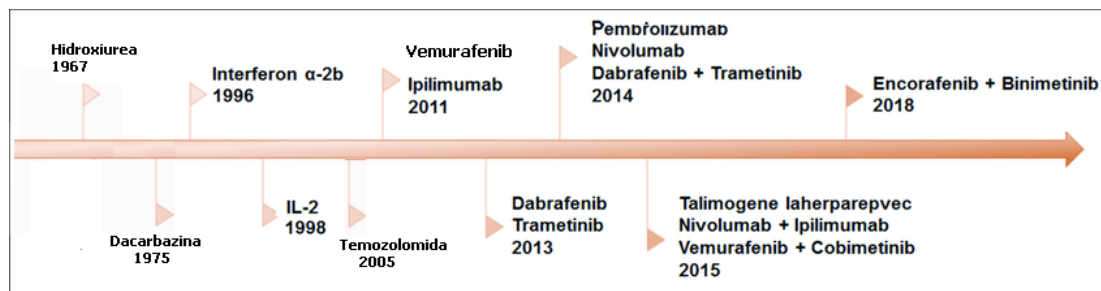


Figura 2. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del melanoma¹⁴.

La **dacarbazina** es un agente alquilante aprobado en 1975 por la FDA. Es un profármaco de monometil tiazenoimidazol carboxamida (MTIC), al igual que **temozolomida**, aprobado por FDA en 2005 (fig. 3). Es el tratamiento quimioterápico estándar para el melanoma metastásico. La quimioterapia afecta a las células durante diferentes estadios del ciclo celular evitando la proliferación celular. Sin embargo, esta terapia no diferencia entre células cancerosas y células sanas, lo que aumenta los efectos secundarios. Diferentes estudios muestran una respuesta completa en menos del 5% de los pacientes y una tasa de supervivencia a los 5 años del 2 al 6%, por lo que ha quedado relegada a un segundo plano en el tratamiento del melanoma¹⁵.

El uso del **interferon (IFN) α -2b** constituyó el punto de partida de la inmunoterapia en el tratamiento del melanoma. Los interferones (IFNs) son citoquinas secretadas por los leucocitos las cuales activan múltiples tipos de células del sistema inmune como las células T, los linfocitos B, los linfocitos natural killer y las células dendríticas e inhiben otros elementos negativos como las células T reguladoras (Tregs). En 1996, la FDA aprobó el uso de interferón α -2b a altas dosis como terapia coadyuvante del tratamiento del melanoma en estadio IIB/III¹⁴.

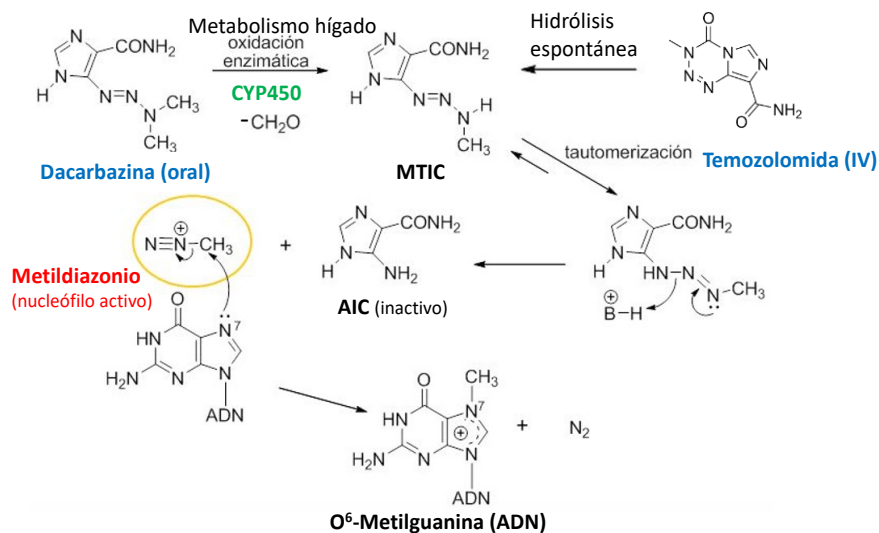


Figura 3. Estructuras y mecanismos de acción de la dacarbazina y temozolomida.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es conocer los diversos factores desencadenantes del melanoma así como el mecanismo patológico que se origina, para comprender mejor el diseño de los nuevos fármacos que se están empleando para interrumpir el crecimiento y progresión de la enfermedad. Además, se describirá el impacto de estas nuevas terapias en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes, así como las futuras direcciones que puede tomar la terapéutica actual contra el melanoma.

3. METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los estudios publicados en bases de datos científicas como *PubMed* (NCBI) y *ScienceDirect*, utilizando las palabras clave “melanoma”, “treatment”, “targeted therapy”, “immunotherapy”, con especial énfasis a las publicaciones entre 2011-2020.

Paralelamente se realizó una búsqueda de ensayos clínicos en la base de datos del *U.S. National Institutes of Health* (NIH) (clinicaltrials.gov), así como páginas web de diferentes organismos como la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), *National Cancer Institute* (NCI) y *PubChem*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años se ha producido un importante progreso en el conocimiento del desarrollo del melanoma, facilitando la aplicación de esta información para el descubrimiento de nuevos fármacos que mejoren los datos de supervivencia en pacientes con melanoma metastásico. La génesis del melanoma afecta a múltiples rutas celulares, incluyendo entre ellas la regulación, desarrollo y transcripción celular, así como la evasión de la respuesta inmunitaria (fig.4).

4.1 Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del melanoma

La cascada MAPK es la ruta con mayor relevancia oncogénica y terapéutica para el melanoma¹⁶ (fig.4). Aproximadamente el 50-60% de los pacientes con melanoma avanzado presenta mutaciones que activan esta vía de señalización, la mayoría de los casos a nivel de la proteína quinasa serina-treonina BRAF¹⁶.

La activación de BRAF inicia la fosforilación de la MAPK quinasa (MEK), que induce a su vez la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). La activación de ERK conduce a carcinogénesis, mediante el incremento de la entrada en el ciclo celular y la

supresión de la apoptosis¹⁷. En el melanoma, la mutación en el gen BRAF hace que la proteína sea demasiado activa, lo que conduce a un crecimiento celular descontrolado e impulsa el desarrollo del cáncer.

Las mutaciones más frecuentes en BRAF son la sustitución de valina (V) por ácido glutámico (E) en el aminoácido 600 (BRAF V600E)¹⁶⁻¹⁷ y la sustitución de valina (V) por lisina (K) en el aminoácido 600 (BRAF V600K). BRAFV600E contribuye a la neoangiogénesis tumoral estimulando la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Un subconjunto pequeño de melanomas muestra alteraciones en el receptor de transmembrana KIT, con actividad tirosina-quinasa (RTK). La unión con su ligando, induce la dimerización y la autofosforilación del receptor, que da lugar a la activación de las vías de señalización de MAPK y PI3K-proteína quinasa B (AKT), que median la supervivencia y la proliferación celular.

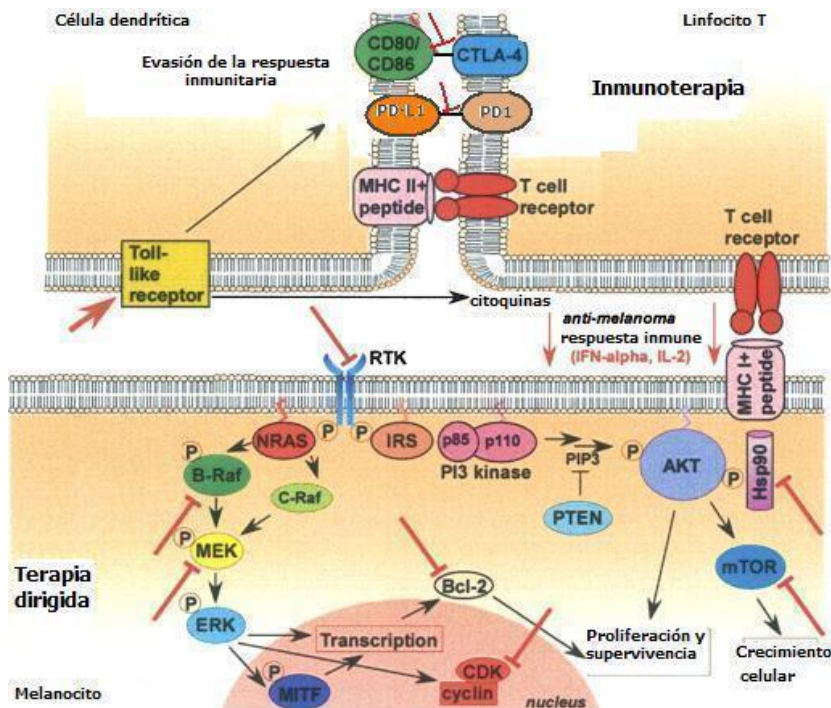


Figura 4. Vías de señalización implicadas en el inicio y desarrollo del melanoma¹⁸.

4.2 Terapia dirigida

La terapia dirigida se basa en la inhibición selectiva de estas proteínas, con lo que se interrumpen las vías de señalización implicadas en la formación del melanoma (fig. 4). Esta terapia consiste en el tratamiento con fármacos que han sido diseñados para diferenciar entre células cancerosas y células sanas. A diferencia de la quimioterapia, la terapia dirigida altera el funcionamiento interno de las células atacando a dianas terapéuticas que sólo expresan las células cancerosas. Por lo tanto, la terapia dirigida presenta unos efectos adversos menores que la quimioterapia, al no atacar a las células sanas. Actualmente, los fármacos aprobados en terapia dirigida contra el melanoma se dirigen a BRAF y MEK. Se están realizando ensayos clínicos con otras posibles dianas terapéuticas como c-Kit, PI3K, mTOR, RAS, VEGF, con resultados prometedores.

4.2.1 Inhibidores de BRAF

Es necesario reseñar que no se aconseja el tratamiento con inhibidores de BRAF para el melanoma con BRAF de tipo natural (no mutado) porque los datos de modelos preclínicos demuestran que los inhibidores de BRAF a veces estimulan, en lugar de inhibir, la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) en células tumorales con BRAF de tipo natural o que tienen mutaciones ubicadas en el gen RAS¹⁹⁻²⁰.

Vemurafenib, aprobado en 2011 por la FDA, es el primer fármaco tomado por vía oral que inhibe selectivamente el crecimiento de las células que tienen mutaciones en BRAF V600E, bloqueando la activación de la cascada MAPK con la inducción de la senescencia celular en la fase G1 del ciclo celular y la apoptosis. La estructura cristalina del complejo BRAF V600E – vemurafenib revela (fig. 5) que la sulfonamida se une selectivamente al sitio catalítico de la forma activa de la quinasa en el bolsillo de unión del ATP, causando un cambio conformacional en la α C-hélice, impidiendo la dimerización del complejo, bloqueando la señalización celular¹⁷.

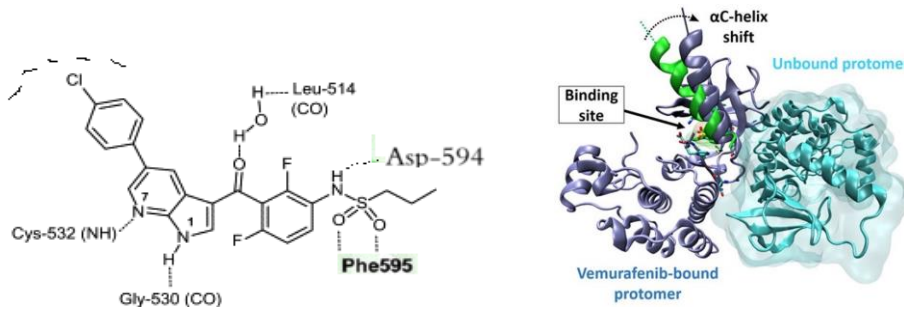


Figura 5. Estructura y unión del vemurafenib a BRAF V600E²¹.

La eficacia de vemurafenib ha sido evaluada en 337 pacientes en el ensayo clínico de fase III BRIM3. Todos los pacientes debían estar diagnosticados de melanoma avanzado con mutación BRAF V600E. En comparación con la dacarbazina, vemurafenib mostró una clara superioridad, con una tasa de respuesta del 48% frente al 5%, una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 6,8 meses frente a 1,6 meses y una supervivencia global (SG) de 13,6 meses frente a 9,7 meses, respectivamente²².

En el año 2013, se aprobó un segundo inhibidor competitivo selectivo de BRAF, **dabrafenib**, para el tratamiento de pacientes con melanoma irresecable con mutación BRAF V600E. Es un tiazol derivado, que se une con mayor afinidad al sitio de unión BRAF quinasa del ATP (fig.6)

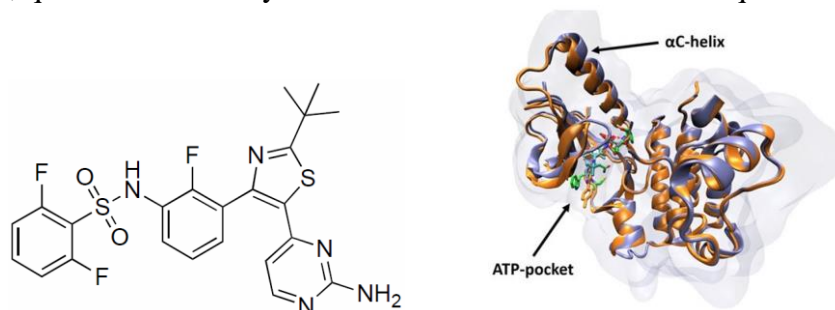


Figura 6. Estructura y unión del dabrafenib a BRAFV600E²³.

La eficacia clínica de dabrafenib fue demostrada en un estudio de fase III en pacientes con melanoma irresecable de estadio III o metastásico (estadio IV) con la mutación BRAF V600. Tras una mediana de seguimiento de 17 meses, la supervivencia libre de progresión (SLP) a los 5 años con dabrafenib fue del 12%, mientras que los pacientes tratados con dacarbazina tuvieron que cambiar de tratamiento por la progresión de la enfermedad²⁴.

Generalmente, los inhibidores BRAF son tolerados correctamente, presentando sólo unos pocos efectos adversos como cambios en la piel, fatiga, diarrea y náuseas. La mayor parte de los efectos adversos graves asociados a estos inhibidores están relacionados con el desarrollo de carcinomas de células escamosas cutáneas o queratoacantomas.

Otro problema asociado al tratamiento con inhibidores de BRAF es la aparición de resistencias. Los mecanismos más frecuentes involucrados en la resistencia del melanoma a inhibidores de MAPK coinciden en la reactivación paradójica de la vía BRAF-MEK-ERK. Los inhibidores de BRAF que se unen al monómero BRAF salvaje (no mutado) pueden inducir cambios conformacionales en la dimerización con un segundo protómero de RAF, capaz de aumentar el flujo de señales a través de la cascada ERK²⁵.

Para combatir esto, se están desarrollando una nueva clase de inhibidores llamados “*paradox breakers*”, los cuales evitan esta activación paradójica de la cascada MAPK a través de la inducción de sutiles cambios estructurales en la α C- hélice y su dimerización. Por lo tanto, estos inhibidores son capaces de inhibir la actividad BRAFV600E sin activar paradójicamente la cascada MAPK en las células que no tienen una mutación en BRAF.

Un ejemplo de estos inhibidores es **PLX8394**, una pequeña molécula de nueva generación, disponible por vía oral, que inhibe selectivamente BRAF V600 sin activar paradójicamente la cascada MAPK²⁶. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase I-II.

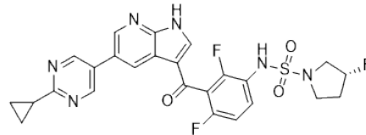


Figura 7. Estructura del PLX8394.

4.2.2 Inhibidores de MEK

Una estrategia válida para reducir la resistencia a los inhibidores de BRAF es inhibir MEK, una quinasa que se encuentra posterior a BRAF en la cascada de señalización (fig.4). En contraste a los inhibidores de BRAF, los inhibidores de MEK muestran actividad en melanomas con NRAS mutado.

Trametinib es un inhibidor alostérico, reversible, administrado por vía oral, altamente selectivo de la señal extracelular activada por mitógenos que regula la activación y la actividad quinasa de MEK1 y MEK2. Es aprobado por la FDA en 2013 para pacientes con melanoma irresecable o melanoma metastásico con una mutación V600E o V600K en BRAF. Trametinib se une al bolsillo alostérico adyacente al sitio de unión del ATP en MEK (fig.8), inhibiendo la fosforilación de ERK1/2 y disminuyendo a su vez la fosforilación de MEK1/2²⁷, evitando la proliferación celular.

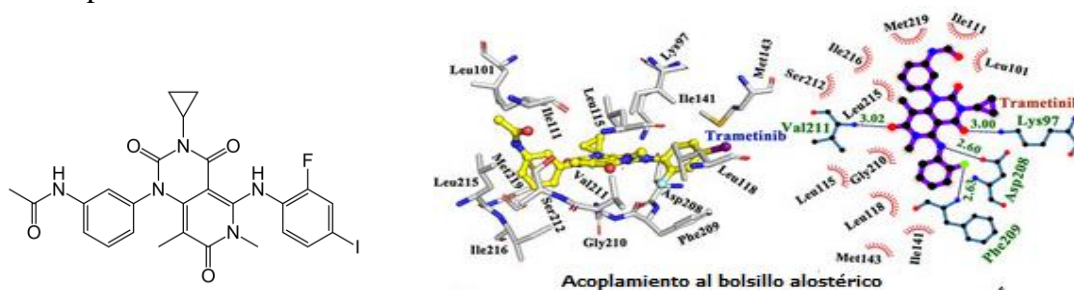


Figura 8. Estructura y unión del trametinib en MEK²⁸.

La eficacia y seguridad de trametinib en pacientes con melanoma no resecable o metastásico con mutación BRAF positiva, se evaluó en el estudio fase III abierto, aleatorizado MEK114267. Este estudio requería, que a todos los pacientes se les diagnosticara la mutación BRAF V600. Trametinib demostró beneficios en la supervivencia libre de progresión frente a la quimioterapia (4,8 meses vs 1,5 meses) y supervivencia general a los 6 meses (81% vs 67%). Sin embargo, el tratamiento con trametinib no está indicado en pacientes que han sido tratados previamente con inhibidores de BRAF, pues no se obtuvo la eficacia deseada²⁹.

La resistencia a los inhibidores de MEK es atribuida a mutaciones que activan MEK1/2 o a cambios en el sitio de unión del fármaco. La reactivación de la vía MAPK ocurre a través de mutaciones secundarias en MEK1. Las células tumorales pueden adaptarse al estrés inducido por fármacos aumentando la autofagia, un proceso por el cual la célula destruye proteínas dañadas en su citoplasma y las recicla aportando nutrientes en condiciones de estrés. Los mecanismos que conducen a una inducción de la autofagia incluyen el estrés del retículo endoplasmático (ERE) y la activación de la familia de los receptores TAM (TYRO3, AXL, MER). Por lo tanto, el uso de inhibidores de la autofagia como la **hidroxicloroquina** es capaz de volver a sensibilizar a las células resistentes a la terapia dirigida. Además, un aumento excesivo de la autofagia mediada por ERE puede provocar la muerte de células tumorales, por lo que el uso de fármacos como el **HA15** conduce a la apoptosis de estas células resistentes³⁰.

4.2.3 Terapia combinada: inhibidores de BRAF + inhibidores de MEK

A pesar de la eficacia inicial de estos nuevos fármacos, la duración de su respuesta puede ser corta debido a que el tumor desarrolla mecanismos de resistencia. Para solventar este inconveniente, han surgido nuevos tratamientos dirigidos a bloquear simultáneamente diferentes niveles de la vía MAPK con una combinación de fármacos contra BRAF y MEK.

En 2014, la FDA aprueba la combinación de **dabrafenib** (BRAF) y **trametinib** (MEK) para pacientes con melanomas irresecables o metastásicos que albergan una mutación V600E o V600K en BRAF. Estudios de fase III muestran que la SLP a los 5 años con dabrafenib + trametinib es del 19%, frente al 13% obtenido con dabrafenib en monoterapia³¹. En 2018, se aprobó una segunda indicación de esta combinación como tratamiento adyuvante del melanoma en estadio III con mutación BRAF V600, tras una resección completa. Los datos actualizados de este estudio (mayo 2020) muestran que la supervivencia libre de recidiva a los 5 años es del 52% con la terapia combinada frente al 36% obtenido con el placebo³².

La combinación de **vemurafenib** (BRAF) y **cobimetinib** (MEK) es aprobada en 2015 por la FDA para pacientes de melanomas irresecables o metastásicos que albergan una mutación V600E o V600K en BRAF. Los datos que avalan la eficacia de cobimetinib y vemurafenib combinados proceden del ensayo clínico aleatorizado pivotal fase III confirmatorio GO28141 (coBRIM) (tabla 4).

Tabla 4. Resumen de eficacia del estudio coBRIM³³ (N=495)

Variable	Cobimetinib + vemurafenib	Placebo + vemurafenib
SLP (meses)	12,6	7,2
SG (meses)	22,5	17,4

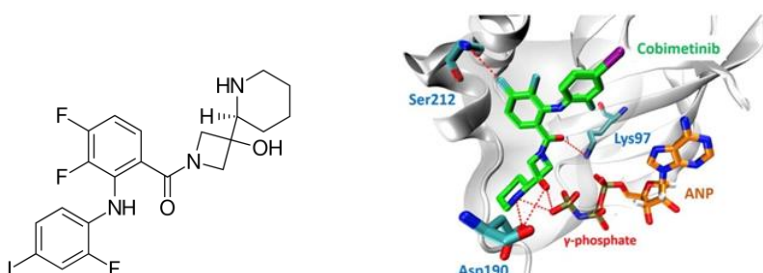
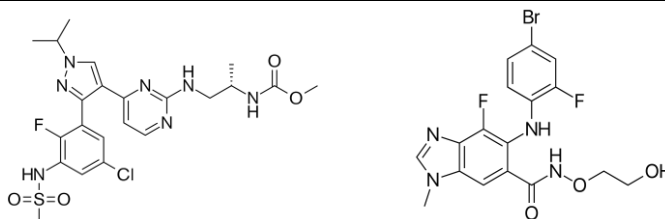


Figura 9. Estructura y unión del cobimetinib al bolsillo alostérico en MEK²¹.

Por último, la FDA aprueba en 2018 la combinación de **encorafenib** (BRAF) y **binimetinib** (MEK) para pacientes con melanoma irresecable o metastásico con mutación de BRAF V600E o V600K. La eficacia de encorafenib en asociación con binimetinib es avalada por el ensayo de fase III COLUMBUS (tabla 5).

Tabla 5. Resultados de las variables de eficacia del estudio COLUMBUS³⁴ (N=577)

Variable	Encorafenib + Binimetinib	Vemurafenib	Encorafenib
Mediana de SLP	14,9 meses	7,3 meses	9,6 meses
Mediana de SG	33,6 meses	16,9 meses	23,5 meses



Figuras 10 y 11. Estructuras del encorafenib y binimetinib.

Pese a que la terapia combinada supone un gran avance en los datos de supervivencia, también pueden aparecer resistencias. Los mecanismos propuestos de resistencia incluyen la amplificación del gen BRAF, cambios en el splicing de BRAF y mutaciones en MEK³⁰.

4.2.4 Inhibidores de c-KIT

C-KIT es un receptor tirosina quinasa activado por la unión del factor de células madre (SCF), que desencadena las vías de señalización del MAPK, dando lugar a efectos de proliferación y supervivencia, particularmente en melanomas de mucosa y acrales. Los inhibidores tirosina quinasa se clasifican en inhibidores tipo I y II. Los inhibidores de tipo I se unen tanto a las conformaciones de quinasas activas como inactivas, mientras que los inhibidores de tipo II reconocen solo las conformaciones inactivas y por tanto, son más selectivos.

Sunitinib es un inhibidor tirosina quinasa de KIT que puede inhibir diversos receptores del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Los melanomas expresan altos niveles de VEGF-A, que induce la angiogénesis al unirse al VEGFR-2 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, lo que se asocia a una mala prognosis. Sunitinib inhibe la angiogénesis al evitar esta unión (fig.12).

La angiogénesis tumoral es la proliferación de un grupo de vasos sanguíneos que penetran en el interior del tumor, aportándole oxígeno y nutrientes, siendo un proceso esencial en el crecimiento progresivo de las neoplasias y en la producción de metástasis.

La eficacia fue evaluada en un estudio de fase II, en el que el tratamiento con sunitinib redujo la densidad venosa induciendo a la hipoxia a 4 modelos de melanoma con diferente perfil angiogénico³⁵.

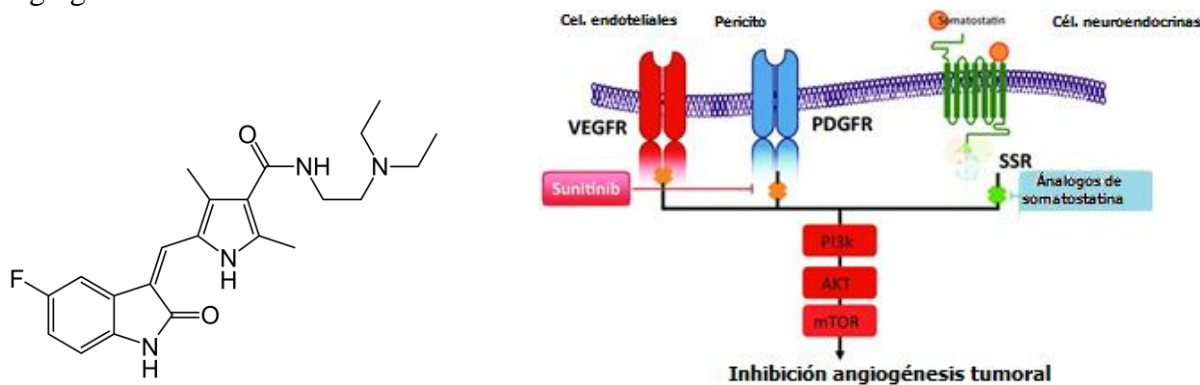


Figura 12. Estructura y unión del sunitinib al receptor VEGF.

Imatinib es un inhibidor oral de c-KIT derivado de 2-fenilaminopirimidina que muestra una actividad significativa en pacientes con melanoma metastásico. El imatinib es un inhibidor tipo II, ya que estabiliza la forma inactiva (DFG-out), ocupa el bolsillo de unión de ATP, la cavidad hidrófoba adyacente y la hendidura "alostérica" (fig.13). La tasa de respuesta al tratamiento del 30%, pero con una SLP de 3-4 meses (estudio de fase II)³⁶.

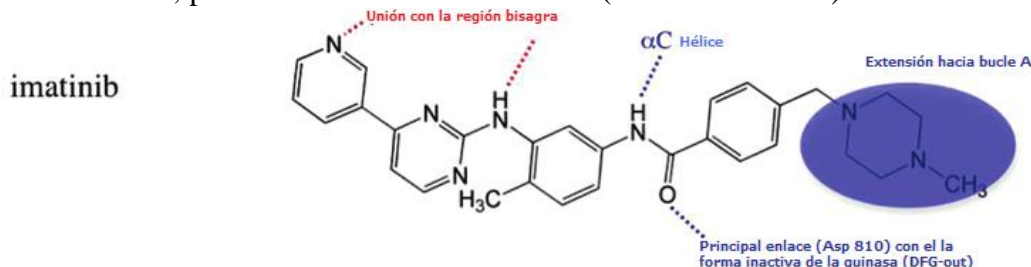


Figura 13. Estructura y unión del imatinib a la conformación no activa c-KIT³⁷.

4.2.5 Futuras direcciones en terapia dirigida

Mientras el principal objetivo de la inhibición de MAPK es prevenir la proliferación oncogénica celular, la apoptosis es controlada por proteínas anti-apoptóticas BCL-2.

Los inhibidores de las vías BRAF y MEK, tienen un efecto eminentemente citostático, lo que refleja la actividad residual de genes anti-apoptóticos en las células tumorales y resulta en la inevitable generación de resistencia.

Actualmente se está investigando el fármaco **AZD5991**, un inhibidor de la molécula MCL1, un mecanismo clave de defensa de las células del melanoma que se activa cuando están expuestas a inhibidores estándar de BRAF y MEK. MCL1 es una proteína antiapoptótica que pertenece a la familia de proteínas BCL-2, reguladas positivamente en las células cancerosas, por lo que van a promover la supervivencia de estas células.

Diversos estudios demuestran que la baja expresión del gen BCL-XL, característica del melanoma, hace recaer la actividad anti-apoptótica sobre MCL1³⁸. AZD5991 se une a MCL1, impidiendo así la inactivación de ciertas proteínas pro-apoptóticas, y promoviendo la apoptosis de las células que sobreexpresan MCL1. Consecuentemente, el uso de AZD5991 convierte en letal el bloqueo de BRAF y MEK, induciendo una apoptosis y regresión tumoral profundas.

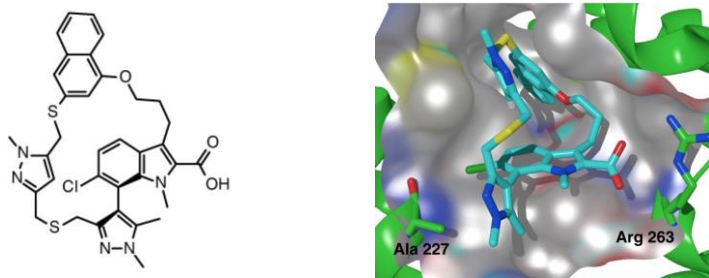


Figura 14. Estructura y modelo de unión del AZD5991.

La vía PI3K-AKT-mTOR es importante en el inicio y progresión del melanoma, por lo que se han realizado diversos estudios acerca de inhibidores duales PI3K-mTOR. La pérdida de PTEN (regulador negativo de PI3K) puede conducir a un aumento de la regulación de la vía PI3K/AKT, cuya activación puede explicar la resistencia intrínseca del melanoma.

Para solucionar este problema, se está investigando con el fármaco **VS-5584** (fase I), que induce la apoptosis caspasa-dependiente en las células del melanoma y su citotoxicidad es contrarrestada con inhibidores de caspasas³⁹. VS-5584 es un inhibidor de PI3K / mTOR quinasa que inhibe la mTOR quinasa y todas las isoformas de PI3K de clase I (fig.15).

A nivel molecular, VS-5584 bloquea la activación de la AKT-mTOR y reduce la expresión de la ciclina D1, proteína reguladora del ciclo celular que se encuentra sobreexpresada en determinados tipos de cáncer, siendo clave en el desarrollo y progresión del melanoma.

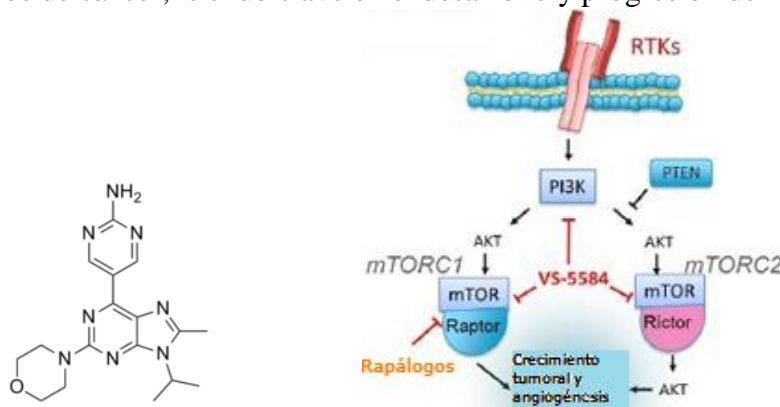


Figura 15. Estructura y mecanismo de acción del VS-5584.

4.3 Inmunoterapia

La inmunoterapia se basa en el uso de fármacos que estimulan el sistema inmunitario del paciente para que reconozca y destruya a las células cancerosas con más eficacia. Desde su introducción, el tratamiento del melanoma ha sufrido una revolución, consiguiéndose cifras de supervivencia superiores a las que se alcanzaban con los tratamientos previos.

El melanoma es considerado un tumor inmunogénico debido a la alta incidencia en pacientes inmunosuprimidos, la remisión espontánea de sus lesiones primarias y los hallazgos histológicos en los infiltrados linfocíticos en los tumores.

4.3.1 Puntos de control inmunitario

Los linfocitos T ejercen una función esencial en la inmunidad celular y en la inmunoterapia del cáncer. Para llevar a cabo sus efectos antitumorales, los linfocitos T citotóxicos deben ser capaces de migrar al tumor y producir lisis celular. Sin embargo, en pacientes con melanoma los linfocitos infiltrantes de tumor pueden presentar baja capacidad de proliferación, producción de citoquinas y lisis celular.

En condiciones fisiológicas normales, los puntos de control inmunitario (*immune checkpoints*) son esenciales para el mantenimiento de la autotolerancia (prevención de autoinmunidad) y proteger del daño tisular cuando el sistema inmune responde frente a un patógeno.

Sin embargo, la regulación de estos puntos de control inmunitario puede ser inducida por tumores, y permitir así una evasión de la respuesta inmune, regulando a la baja la activación del sistema inmunitario, previniendo la sobreactivación de linfocitos T, promoviendo la autotolerancia y evitando la autoinmunidad. Estos correceptores son **CTLA-4** y **PD-1**⁴⁰, las principales dianas de la inmunoterapia contra el melanoma:

- **CTLA-4**, expresado en la membrana de los linfocitos T, compete con CD-28 por unirse a B-7. La unión CTLA-4/B-7 bloquea la señal co-estimuladora transmitiendo una señal inhibitoria a los linfocitos T.
- A nivel del microambiente tumoral, **PD-1**, expresado en los linfocitos T, se une a los ligandos PD-L1 y PD-L2. Esta unión inhibe la activación de los linfocitos T, reduciendo la proliferación y función de linfocitos T CD8+ citotóxicos, induciendo la apoptosis de los mismos.

Estos dos mecanismos de regulación negativos constituyen el principal obstáculo para la actividad antitumoral de los linfocitos T. Por consiguiente, el bloqueo de estas vías inhibitorias mediante el uso de anticuerpos monoclonales es una estrategia que permite frenar el crecimiento tumoral al potenciar la respuesta inmune antitumoral.

4.3.2 Fármacos anti-CTLA-4

Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal humano que al administrarse por vía venosa se fija a CTLA-4, limitando así su capacidad de inhibir la activación, la proliferación y la función efectora de las células T (fig.16). Ipilimumab es un tratamiento de primera línea con o sin mutación BRAF aprobado por la FDA en 2011.

Este fármaco ha demostrado beneficios clínicos en el estudio CA184024 (fase III), que comparó la eficacia del tratamiento combinado ipilimumab + dacarbazina frente a la monoterapia con dacarbazina en pacientes que no habían recibido tratamiento previo (tabla 6).

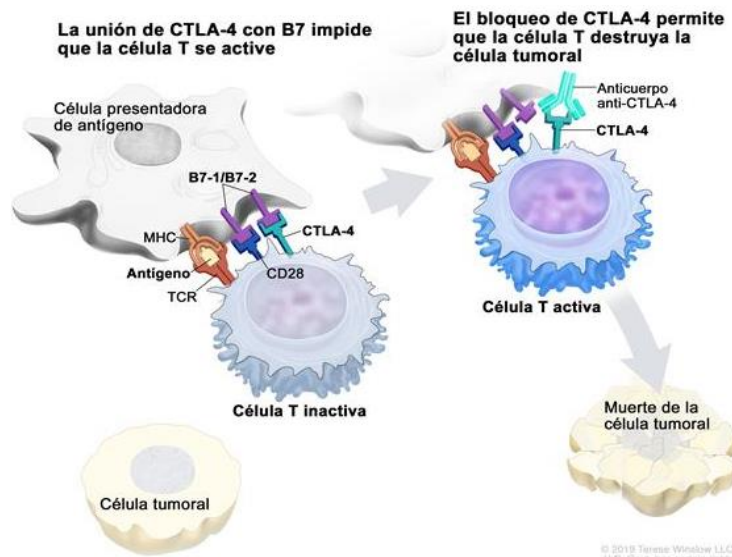


Figura 16. Mecanismo de acción de los anti-CTLA-4.

Tabla 6. Resultados del estudio CA184-024⁴¹

Variable	Ipilimumab + dacarbazina (n=250)	Placebo + dacarbazina (n=252)
SG (meses)	11,2	9,1
Tasa de SG a 3 años (%)	20,8	12,2
Duración de la respuesta	19,3 meses	8,1 meses

Debido a su mecanismo de acción, ipilimumab está asociado a un gran número de efectos adversos, de los cuales muchos son de origen autoinmuntario. El 60% de los pacientes con este fármaco desarrolla efectos adversos como diarrea, colitis, dermatitis, hipofisitis y tiroiditis⁴².

4.3.3 Fármacos anti-PD-1/PD-L1

Nivolumab es el primer anticuerpo monoclonal IgG4 anti PD-1 que ha sido evaluado en distintos tipos de cáncer. Su afinidad por PD-1 bloquea la interacción de este receptor con los ligandos PD-L1 y PD-L2, incrementando la proliferación específica de linfocitos T y citoquinas⁴³ (fig.17).

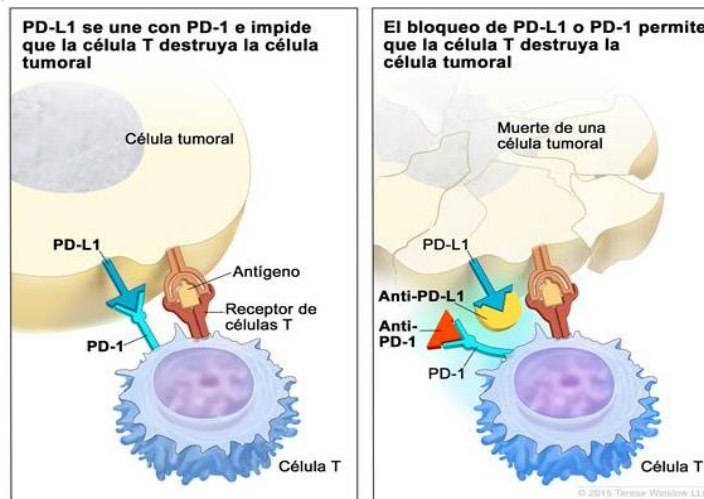


Figura 17. Mecanismo de acción de los anti-PD-1/PD-L1.

La eficacia de nivolumab es demostrada en 2015 en el ensayo clínico de fase III CheckMate 066, que compara la tasa de supervivencia global a los 3 años con el uso de nivolumab frente a dacarbazina en pacientes con melanoma metastásico sin mutación en BRAF. Tras un seguimiento de 38 meses, la tasa de supervivencia global (SG) a los 3 años con nivolumab fue del 51,2%, mientras que con la dacarbazina se obtuvo un 21,6%⁴⁴.

Pembrolizumab es el anticuerpo monoclonal con la mayor afinidad por PD-1. Este fármaco está diseñado para bloquear, sin citotoxicidad dependiente del complemento o anticuerpo, la interacción entre el receptor PD-1 y los ligandos PD-L1 y PD-L2, por lo que en 2015 recibe la aprobación para el tratamiento del melanoma avanzado (irreseccable o metastásico)⁴⁵. En diciembre de 2018, tras analizar los resultados del ensayo pivotal fase 3 KEYNOTE-05449, la Comisión Europea aprueba una segunda indicación del pembrolizumab como tratamiento adyuvante en adultos con melanoma en estadio III y con afectación de los ganglios linfáticos que hayan sido sometidos a resección completa⁴⁶. Los datos de este estudio muestran que tras una mediana de seguimiento de 15 meses, la tasa de SLP a 12 meses fue de 75,4 % en el grupo de pembrolizumab versus 61,0 % en el grupo de placebo. El efecto del pembrolizumab se mantuvo independientemente de la expresión de PD-L1 o de la mutación en BRAF.

Prolgolimab es el primer anticuerpo monoclonal de IgG1 anti-PD-1 con mutación Fc "LALA" (la fracción Fc carece de función efectora para evitar efectos secundarios como la trombocitopenia⁴⁷) contra el melanoma avanzado. Ha sido aprobado en Rusia (abril 2020) tras cumplir los objetivos marcados a nivel de tasa de respuesta objetiva (ORR) y actividad antitumoral en el ensayo de fase II NCT03269565⁴⁸.

La ventaja de los anticuerpos dirigidos contra PD-L1, en comparación con los anticuerpos anti-PD-1, radica en que pueden inhibir las interacciones PD-1/PD-L1 dejando intacta la vía de PD-1/PD-L2, con lo que se conserva potencialmente la homeostasis inmunitaria periférica.

Atezolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 modificado mediante ingeniería genética, anti PD-L1. Este fármaco está siendo investigado en combinación con cobimetinib (MEK) y vemurafenib (BRAF). Los resultados del ensayo de fase III (NCT02908672) en 513 pacientes con melanoma avanzado que previamente no habían sido tratados de la mutación BRAF V600 muestran que esta combinación mejora la SLP y la duración media de la respuesta (DOR) (tabla 7).

Tabla 7. Resultados provisionales del estudio NCT02908672⁴⁹

Variable	Atezolizumab + Cobimetinib + Vemurafenib	Placebo + Cobimetinib + Vemurafenib
SLP (meses)	15,1	10,6
DOR (meses)	21	12,6

4.3.4 Terapia combinada: anti-CTLA-4 + anti PD-1 / Inmunoterapia + terapia dirigida

A pesar de la eficacia de estas nuevas terapias, los tumores pueden desarrollar resistencias adaptativas que causen una disminución de la eficacia del fármaco. Algunos de estos mecanismos de resistencia son el incremento de la producción de citoquinas inmunosupresoras (IL-4, IL-10, IL-13) y la sobreexpresión del ligando PD-L1 (biomarcador), que lleva al agotamiento y disfunción de los linfocitos T, estimulando además su apoptosis⁵⁰.

En la actualidad, se están investigando terapias combinadas que reduzcan la aparición de resistencias y aumenten la eficacia de los fármacos, mejorando los datos de supervivencia⁵¹.

Nivolumab (anti PD-1) + **Ipilimumab** (anti CTLA-4) +: Esta combinación es aprobada por la FDA en 2015 para pacientes con melanoma irsecable o metastásico sin mutaciones de BRAF. Estudios de fase II/III muestran que la combinación tiene mayor actividad antitumoral en comparación a la monoterapia con ipilimumab. La SLP fue significativamente mayor, independientemente del estado mutacional de BRAF; 11,5 meses con el tratamiento combinado, 2,9 meses con ipilimumab y 6,9 meses con nivolumab⁵². La tasa de respuesta objetiva fue del 57,6% en pacientes tratados con esta combinación, mientras que ambos medicamentos en monoterapia presentaron tasas más bajas (43,7% y 19% respectivamente).

Un enfoque interesante podría ser la combinación de la inmunoterapia con terapia dirigida. El tratamiento con inhibidores de BRAF/MEK ha demostrado incrementar la expresión de antígenos tumorales y por tanto favorecer la respuesta inmunitaria, por lo que la combinación de ambos tratamientos puede tener una acción sinérgica mejorando la supervivencia⁵³⁻⁵⁴.

Por ejemplo, la combinación de **spartalizumab** (anti PD-1), dabrafenib (BRAF) y trametinib (MEK) puede mejorar la tasa de respuesta objetiva (ORR) en pacientes con melanoma avanzado no tratado previamente y con mutación BRAFV600E. En concreto, la ORR fue del 75% y las tasas de SLP y SG a los 12 meses fueron del 65.3% y 85.9% (ensayo fase III)⁵⁵.

Estudios adicionales están actualmente en marcha para evaluar la eficacia y seguridad de nuevas combinaciones.

4.3.5 Viroterapia oncolítica

Talimogene laherparepvec (T-VEC) es el primer virus oncolítico aprobado contra el melanoma irsecable o metastásico⁵⁶ (estadio IIIB, IIIC y IVM1a). T-VEC es un herpes virus simple tipo 1 atenuado, generado por la supresión funcional de 2 genes (ICP34.5, para suprimir la replicación del virus en tejidos normales e ICP47, para sobreexpresar el gen US11 que facilita la replicación del virus modificado) al que se le ha insertado la secuencia de codificación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (GM-CSF). Es un virus que se produce en células Vero mediante tecnología del ADN recombinante y se administra directamente por vía intravenosa en el tumor (terapia intralesional).

T-VEC se replica selectivamente en células con elevada capacidad de división, como las células tumorales, produciendo oncolisis celular (efecto local), que va a provocar una respuesta inmune específica frente al tumor. Además, la expresión del GM-CSF humano incrementa la respuesta inmune sistémica al reclutar y estimular las células presentadoras de antígenos. Esto activa las células T CD8 + específicas de tumor e inicia una respuesta antitumoral sistémica (fig.18).

El uso de T-VEC está contraindicado en pacientes inmunocomprometidos o en mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

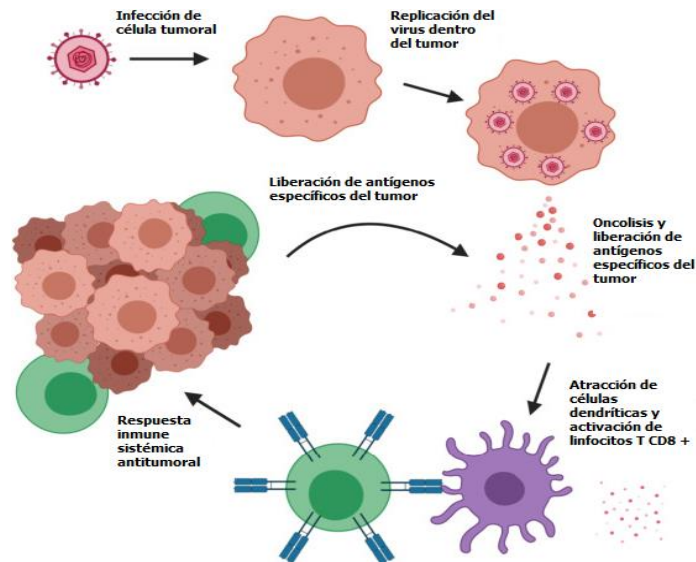


Figura 18. Mecanismo de oncolisis viral por T-VEC y respuesta inmunológica⁵⁶.

La eficacia de T-VEC en pacientes con melanoma irresecable metastásico se centra en los resultados de un estudio pivotal fase III, (OPTiM study), conocido también como ensayo 005/05 (tabla 8), así como en los resultados del estudio 002/03, un ensayo fase II que sirvió de soporte desde el punto de vista de eficacia a la solicitud.

Tabla 8. Principales resultados del ensayo 005/05⁵⁷

Variable	Talimogene laherparepvec N = 295	GM-CSF N = 141
Tasa de respuesta duradera	16,3%	2,1%
Supervivencia global	23,3 meses	18,9 meses
Tiempo hasta el fracaso del tratamiento	8,2 meses	2,9 meses

4.3.6 Futuras direcciones en inmunoterapia

Además de CTLA-4 y de PD-1, se está investigando otro punto de control inmunitario que puede ser importante en el desarrollo del melanoma. Es el caso de **LAG-3**, presente en la membrana de linfocitos natural killer, linfocitos B y células T activadas.

Sus ligandos incluyen el MHC de clase II que se expresan en células presentadoras de antígenos, GAL-3 y LSEctin (*liver sinusoidal endothelial cell lectin*). LAG-3 produce un efecto inhibitor en diferentes tipos de linfocitos y muestra una sinergia remarcable con PD-1 para inhibir la respuesta inmunitaria.

La inmunoterapia en LAG-3 está avanzando en diferentes ensayos clínicos. Actualmente se encuentra en desarrollo el **relatlimab**, un fármaco anti LAG-3 que en combinación con nivolumab puede ser un tratamiento efectivo para pacientes con melanoma metastásico previamente tratados con inmunoterapia y sin posibilidad de abordaje quirúrgico⁵⁸.

Otra posible diana terapéutica es la **indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO)**, una enzima catabólica producida por los macrófagos y las células T reguladoras (T-regs) para convertir el triptófano, necesario para la función efectora de las células T, en quinurenina.

La tolerancia inmunológica es promovida por la deficiencia de triptófano mediada por IDO, con la diferenciación de linfocitos T vírgenes en T-regs⁵⁹.

Diferentes estudios señalan que la indoleamina 2,3-dioxigenasa se encuentra sobreexpresada en melanomas tratados con anti-CTLA-4 y anti-PD-1⁵⁹, lo que le confiere resistencia y crecimiento al tumor. Se están investigando diversas combinaciones de inhibidores de puntos de control inmunitario con el **epacadostat** (fig.19), un inhibidor oral de la indoleamina 2,3-dioxigenasa. Actualmente, los ensayos clínicos (fase I/II) se centran en la combinación de epacadostat con ipilimumab (anti CTLA-4), ya que la combinación de epacadostat con pembrolizumab (anti PD-1) resultó ser ineficaz en un ensayo de fase III⁶⁰. Por el momento, estos ensayos sugieren que la combinación epacadostat con ipilimumab puede ser efectiva, ya que se obtuvo una mayor tasa de control de la enfermedad (64% vs 49%) y SLP (7,5 meses vs 4,1 meses) en comparación con pacientes que recibieron placebo + ipilimumab⁶¹.

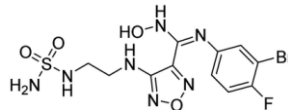


Figura 19. Estructura del epacadostat

4.4 Algoritmo de tratamiento

Las decisiones actuales sobre el tratamiento del melanoma irreseccable y/o metastásico se basan en varios parámetros y la elección entre un fármaco u otro debe ser individualizada para cada paciente con el fin de mejorar la seguridad y eficacia del tratamiento.

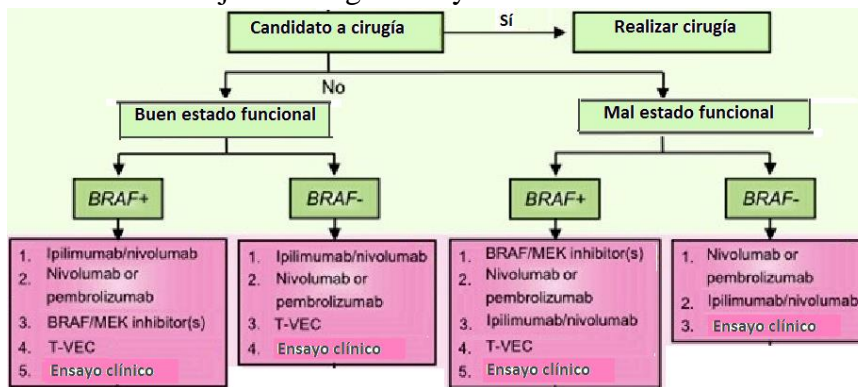


Figura 20. Algoritmo de tratamiento del melanoma avanzado⁶²

5. CONCLUSIONES

El conocimiento de la patogénesis del melanoma ha sido crucial para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. La identificación de diferentes vías oncogénicas ha permitido la aparición de diversos tratamientos como la terapia dirigida o la inmunoterapia. La llegada de estas terapias ha revolucionado el tratamiento del melanoma ya que ha resultado una mejora muy significativa de la atención y esperanza de vida de los pacientes.

En consecuencia, el tratamiento del melanoma metastásico ha experimentado importantes avances con la llegada de nuevos fármacos (anti CTLA-4/anti PD-1, viroterapia oncolítica, inhibidores BRAF en monoterapia o en combinación con inhibidores MEK) que han demostrado ser superiores a la quimioterapia tradicional (dacarbazina).

Sin embargo, la heterogeneidad de los tumores conlleva a diferentes mecanismos de resistencia, con una indudable influencia negativa en los resultados terapéuticos. Nuevas investigaciones señalan que la terapia combinada puede ser el método más idóneo para evitar la aparición de resistencias, atacando simultáneamente distintas vías.

La investigación en el campo de la terapia dirigida y la inmunoterapia en el melanoma debe enfocarse a identificar criterios de selección para candidatos sensibles al tratamiento y explorar qué fármacos en monoterapia o combinados ofrecen mejores respuestas, más aún si tenemos en cuenta que no todos los pacientes responden y/o toleran los tratamientos de igual manera.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. SEOM | Día Mundial del Cáncer 2020. (2020). *Cifras del cáncer en España | SEOM - Día Mundial del Cáncer 2020*. Disponible en: <https://seom.org/dmccancer/cifras-del-cancer/>
2. Seom.org. (2020). *Melanoma - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019*. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/melanoma>
3. Arisi M, Zane C, Caravello S, Rovati C, Zanca A, Venturini M et al. *Sun Exposure and Melanoma, Certainties and Weaknesses of the Present Knowledge*. *Frontiers in Medicine*. 2018;5.
4. Eggermont A, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2014;383(9919):816-827.
5. Pampena R, Lai M, Piana S, Lallas A, Pellacani G, Longo C. *Nevus-associated melanoma: facts and controversies*. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. 2020;155(1).
6. Li W, Cho E, Weinstock M, Li S, Stampfer M, Qureshi A. *Cutaneous nevi and risk of melanoma death in women and men: A prospective study*. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019;80(5):1284-1291.
7. Gandini S, Sera F, Cattaruzza M, Pasquini P, Abeni D, Boyle P et al. *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. *European Journal of Cancer*. 2005;41(1).
8. Goldstein A, Tucker M. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2013;22(4):528-532.
9. Read J, Wadt K, Hayward N. Melanoma genetics. *Journal of Medical Genetics*. 2015;53(1):1-14.
10. Begg C, Orlow I, Hummer A, Armstrong B, Krickler A, Marrett L et al. *Lifetime Risk of Melanoma in CDKN2A Mutation Carriers in a Population-Based Sample*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(20):1507-1515.
11. Huerta C, Garcia-Casado Z, Bañuls J, Moragon M, Oliver V, Unamuno B et al. *Characteristics of Familial Melanoma in Valencia, Spain, Based on the Presence of CDKN2A Mutations and MC1R Variants*. *Acta Dermato Venereologica*. 2018;98(5):512-516.
12. Scherer D, Kumar R. *Genetics of pigmentation in skin cancer — A review*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2010;705(2):141-153.
13. Melanoma of the Skin. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer, 2017.
14. Zhu Z, Liu W, Gotlieb V. *The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016;99:91-99.
15. Kim C, Lee C, Kovacic L, Shah A, Klasa R, Savage K. *Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide*. *The Oncologist*. 2010;15(7):765-771.
16. Patel H, Yacoub N, Mishra R, White A, Yuan L, Alanazi S et al. *Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma*. *Cancers*. 2020;12(2):482.
17. Cerchia C, Lavecchia A. *Small Molecule Drugs and Targeted Therapy for Melanoma: Current Strategies and Future Directions*. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(21).
18. Chin L. *Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era*. *Genes & Development*. 2006;20(16):2149-2182.
19. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber B, Anderson D, Alvarado R et al. *RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth*. *Nature*. 2010;464(7287).
20. Poulidakos P, Zhang C, Bollag G, Shokat K, Rosen N. *RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF*. *Nature*. 2010;464(7287):427-430
21. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K et al. *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer*. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(11):873-886.
22. Chapman P, Robert C, Larkin J, Haanen J, Ribas A, Hogg D et al. *Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study*. *Annals of Oncology*. 2017;28(10):2581-2587.
23. Millet A, Martin A, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. *Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges*. *Medicinal Research Reviews*. 2016;37(1):98-148.

24. Hauschild A, Ascierto P, Schadendorf D, Grob J, Ribas A, Kiecker F et al. *Long-term outcomes in patients with BRAF V600-mutant metastatic melanoma receiving dabrafenib monotherapy: Analysis from phase 2 and 3 clinical trials*. *European Journal of Cancer*. 2020;125:114-120.
25. Benito-Jardón L, Díaz-Martínez M, Arellano-Sánchez N, Vaquero-Morales P, Esparís-Ogando A, Teixidó J. *Resistance to MAPK Inhibitors in Melanoma Involves Activation of the IGF1R–MEK5–Erk5 Pathway*. *Cancer Research*. 2019;79(9):2244-2256.
26. Tutuka C, Andrews M, Mariadason J, Ioannidis P, Hudson C, Cebon J et al. *PLX8394, A new generation BRAF inhibitor, selectively inhibits BRAF in colonic adenocarcinoma cells and prevents paradoxical MAPK pathway activation*. *Molecular Cancer*. 2017;16(1).
27. Flaherty K, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M et al. *Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma*. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(2):107-114.
28. Zhu J, Li C, Yang H, Guo X, Huang T, Han W. *Computational Study on the Effect of Inactivating/Activating Mutations on the Inhibition of MEK1 by Trametinib*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(6):2167.
29. Shah D. J., Dronca R. S. *Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma*. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(4):504-519.
30. Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S. *Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2019;1871(2):313-322
31. Robert C, Grob J, Stroyakovskiy D, Karaszewska B et al. *Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma*. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(7):626-636.
32. Hauschild A, Dummer R, Santinami M, Atkinson V et al. *Long-term benefit of adjuvant dabrafenib + trametinib (D+T) in patients (pts) with resected stage III BRAF V600-mutant melanoma: Five-year analysis of COMBI-AD*. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(15_suppl).
33. McArthur GA, Dréno B, Larkin J, et al. *5-year survival update of cobimetinib plus vemurafenib BRAF V600 mutation-positive advanced melanoma: final analysis of the coBRIM study*. 16th International Congress of the Society for Melanoma Research; November 20-23, 2019.
34. Dummer R, Ascierto P, Gogas H, Arance A, Mandala M, Liskay G et al. *Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. *The Lancet Oncology*. 2018;19(10):1315-1327.
35. Gaustad J, Simonsen T, Andersen L, Rofstad E. *The Effect of Sunitinib Treatment in Human Melanoma Xenografts: Associations with Angiogenic Profiles*. *Translational Oncology*. 2017;10(2):158-167.
36. Hodi F, Corless C, Giobbie-Hurder A, Fletcher J, Zhu M, Marino-Enriquez A et al. *Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin*. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(26):3182-3190
37. DiNitto J, Wu J. *Molecular mechanisms of drug resistance in tyrosine kinases cAbl and cKit*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;46(4):295-309.
38. Sale M, Minihane E, Monks N, Gilley R, Richards F, Schifferli K et al. *Targeting melanoma's MCL1 bias unleashes the apoptotic potential of BRAF and ERK1/2 pathway inhibitors*. *Nature Communications*. 2019;10(1).
39. Shao Z, Bao Q, Jiang F, Qian H, Fang Q, Hu X. *VS-5584, a Novel PI3K-mTOR Dual Inhibitor, Inhibits Melanoma Cell Growth In Vitro and In Vivo*. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0132655.
40. Seidel J, Otsuka A, Kabashima K. *Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations*. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
41. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. *New Engl J Med* 2011;2517-2526.
42. Escandell I, Martín J, Jordá E. *Novel Immunologic Approaches to Melanoma Treatment*. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. 2017;108(8):708-720.
43. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powder JD, Picus J, Sharfman WH, et al. *Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates*. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3167-3175.

44. Ascierto P, Long G, Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo A et al. *Survival Outcomes in Patients With Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated With Nivolumab Therapy*. JAMA Oncology. 2019;5(2):187.
45. Robert, C., Schachter, J., Long, G., et al. *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. New England Journal of Medicine. 2015;372(26):2521-2532.
46. Eggermont A, Blank C, Mandala M, Long G, Atkinson V, Dalle S et al. *Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma*. New England Journal of Medicine. 2018;378(19):1789-1801.
47. Borrok M, Mody N, Lu X, et al. *An “Fc-Silenced” IgG1 Format With Extended Half-Life Designed for Improved Stability*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;106(4):1008-1017.
48. Tjulandin S, Fedyanin M et al. *Final Results of Phase II Trial (MIRACULUM) of the Novel PD-1 Inhibitor Progolimab in Patients with Advanced Melanoma*. Annals of Oncology. 2019;30.
49. McArthur GA, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. *CT012 – Evaluation of atezolizumab (A), cobimetinib (C), and vemurafenib (V) in previously untreated patients with BRAFV600 mutation-positive advanced melanoma: primary results from the phase 3 IMspire150 trial*. 2020 AACR Annual Virtual Meeting I; April 27-28, 2020.
50. Seto T, Sam D, Pan M. *Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer*. Medical Sciences. 2019;7(2):14.
51. Pelster M, Amaria R. *Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials*. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 2019;11:175883591983082.
52. Wolchok J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J, Cowey C et al. *Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. New England Journal of Medicine. 2017;377(14):1345-1356.
53. Gellrich F, Schmitz M, Beissert S, Meier F. *Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma—An Update*. Journal of Clinical Medicine. 2020;9(1):223.
54. Frederick D, Piris A, Cogdill A, Cooper Z, Lezcano C, Ferrone C et al. *BRAF Inhibition Is Associated with Enhanced Melanoma Antigen Expression and a More Favorable Tumor Microenvironment in Patients with Metastatic Melanoma*. Clinical Cancer Research. 2013;1225-1231.
55. Long G, Lebbe C, Atkinson V et al. *The anti-PD-1 antibody spartalizumab (S) in combination with dabrafenib (D) and trametinib (T) in previously untreated patients (pts) with advanced BRAF V600-mutant melanoma: Updated efficacy and safety from parts 1 and 2 of COMBI-I*. Journal of Clinical Oncology. 2020;38(5_suppl):57-57.
56. Haitz K, Khosravi H, Lin J, Menge T et al. *Review of talimogene laherparepvec: A first-in-class oncolytic viral treatment of advanced melanoma*. JAAD. 2020;83(1):189-196.
57. Harrington K, Andtbacka R, Collichio F, Downey G, Chen L, Szabo Z et al. *Efficacy and safety of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with stage IIIB/C and IVM1a melanoma: subanalysis of the Phase III OPTiM trial*. OncoTargets and Therapy. 2016;Volume 9:7081-7093.
58. Ascierto P, Melero I, Bhatia S, Bono P, Sanborn R, Lipson E et al. *Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti-LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti-PD-1/PD-L1 therapy*. Journal of Clinical Oncology. 2017;35(15_suppl):9520-9520.
59. Sucher R, Kurz K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D, Brandacher G. *IDO mediated tryptophan degradation in the pathogenesis of malignant tumor disease*. Int J Tryptophan Res. (2010) 3:113–20.
60. Long G, Dummer R, Hamid O et al. *Epacadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study*. The Lancet Oncology. 2019;20(8):1083-1097.
61. Gibney G, Hamid O et al. *Phase 1/2 study of epacadostat in combination with ipilimumab in patients with unresectable or metastatic melanoma*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2019;7(1).
62. Michielin O, van Akkooi A, Ascierto P, Dummer R, Keilholz U. *Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology. 2019;30(12):1884-1901.