



Bases moleculares del tratamiento del melanoma metastásico cutáneo

Integrantes del equipo: Paola Chiappino, María Belen Cuadra
Daniele da Rosa, Estéfany González, Julieta Guidi
Valentina Guzzetti

Orientadores: Jennyfer Martínez, Celia Quijano.

Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO),
Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Ciclo de Metodología Científica II-2017. Grupo 89.

Contenido

Resumen.....	3
Introducción	3
Materiales y Métodos	5
Quimioterapia	5
<i>Agentes metilantes y mecanismos de reparación del ADN</i>	5
<i>Activación de la vía de respuesta al daño en el ADN</i>	6
<i>Apoptosis inducida por quimioterapia</i>	7
<i>Senescencia inducida por quimioterapia</i>	9
<i>Efectividad y efectos adversos</i>	9
Terapias dirigidas	9
<i>Vía de las proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK)</i>	9
<i>Bases moleculares de la terapia dirigida</i>	11
<i>Mecanismos de resistencia y terapias combinadas</i>	14
Inmunoterapias	14
<i>Activación de los linfocitos T</i>	16
<i>Inhibición de los linfocitos T</i>	17
<i>Efectividad y efectos adversos</i>	19
Conclusiones	21
Bibliografía	22

Resumen

El melanoma cutáneo es responsable de la mayoría de las muertes debidas al cáncer de piel. La incidencia en Uruguay es de 5-7 por 100.000 habitantes aproximadamente. Cuando la enfermedad se encuentra en estadio avanzado, el tratamiento de la misma se basa en tres tipos de terapia: quimioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia. La primera en utilizarse fue la quimioterapia a partir de la aprobación por la FDA del fármaco dacarbazina (DTIC) en 1975. Éste es un agente metilante encargado de metilar a la posición O6 de la guanina, lo que conduce a la ruptura de doble hebra de la hélice del ADN y por último a la apoptosis. El melanoma presenta una gran cantidad de mutaciones características de la exposición a UV. El descubrimiento de que un gran número de las mutaciones en el melanoma resulta en la activación constitutiva de la vía de las MAPK, condujo a la creación de las terapias dirigidas. El 50% de estas mutaciones ocurren en B-RAF, para la cual se crearon los fármacos inhibidores de B-RAF mutado, vemurafenib y dabrafenib y los inhibidores MEK como el trametinib. Los quimioterápicos y terapias dirigidas conducen a la apoptosis y/o al cese de la proliferación en la senescencia celular. A su vez, sabiendo que el melanoma es un cáncer muy inmunogénico, se crearon inmunoterapias con el objetivo de inhibir los puntos de control del sistema inmune. El ipilimumab es un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir a CTLA-4 (inhibidor de los linfocitos T) generando así un aumento en la respuesta inmune tumoral. Otra terapia inmunológica utilizada en el melanoma son los inhibidores de PD-1. PD-1 es otra molécula que actúa como inhibidor de los linfocitos T con un mecanismo de acción distinto a CTLA-4 pero con el mismo objetivo, el control de la inmunidad. El anticuerpo anti-PD-1, nivolumab, fue uno de los últimos fármacos aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma en el 2014. En esta monografía se abordarán las bases moleculares de las distintas terapias contra el melanoma metastásico cutáneo, identificando los distintos blancos de los agentes terapéuticos y los eventos y cascadas de señalización que conducen a la muerte celular y la generación de resistencia.

Palabras clave: melanoma metastásico cutáneo, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, respuesta al daño al ADN, MAPK, PD-1, CTLA-4, apoptosis.

Introducción

El melanoma es una neoplasia maligna de los melanocitos, células productoras de melanina, presentes en todo el cuerpo; incluyendo la piel, el iris y el recto. La forma cutánea de la enfermedad es la más común y es responsable de la mayoría de las muertes debidas al cáncer de piel. Es por esto que nos centraremos en el melanoma cutáneo. Su incidencia global es de 15-25 por 100.000 individuos (1) mientras que la incidencia en Uruguay es de 5-7 por 100.000 habitantes aproximadamente (2).

La exposición a los rayos ultravioletas es el principal factor de riesgo para el melanoma cutáneo y conduce a una firma genética que es característica del melanoma (3). Esta firma consiste en una alto número de transiciones citosina timimina (1). Dentro de las mutaciones descritas en el melanoma, se destacan las presentes en la vía de las proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK), siendo la mutación de la proteína B-RAF la predominante (1). También se han descrito mutaciones en la vía de las quinasa dependientes de ciclinas (CDK), principalmente en el locus CDKN2A que codifica la proteína p16, un inhibidor de CDK (1, 4). A pesar de las numerosas campañas públicas de prevención llevadas a cabo, sigue habiendo un aumento continuo global de las tasas de incidencia para el melanoma metastásico cutáneo (5).

Si el melanoma es detectado precozmente, o sea, si la enfermedad es localizada o loco regional (a lo sumo ganglios linfáticos regionales positivos), la cirugía está indicada como tratamiento potencialmente curativo. Sin embargo, en pacientes con melanoma metastásico en estadio avanzado, la cirugía no suele ser una opción curativa (6) . En estos casos se recurre a la terapia. Entre las opciones terapéuticas encontramos la quimioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia.

La primer línea de tratamiento que se utilizó para pacientes con melanoma en estadio avanzado fue la quimioterapia. El primer agente quimioterapéutico utilizado para esta indicación fue la dacarbazina (DTIC), aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) hace más de 30 años (1975) (7). Posteriormente se aprobó el uso de IL-2 (1998), pero se limitó el uso por altos niveles de toxicidad (8). Desde su aprobación, la DTIC junto su análogo la temozolomida (TMZ), fueron los únicos fármacos utilizados para el tratamiento paliativo de pacientes con melanoma metastásico; hasta el 2011 cuando se aprobó el uso del ipilimumab, un anticuerpo monoclonal anti CTLA4, y del vemurafenib, un inhibidor de B-RAF mutado. Hasta el 2011, ningún ensayo clínico aleatorio había proporcionado evidencia de mejorar la supervivencia de los pacientes con melanoma metastásico en estadio avanzado. Sin embargo, en los últimos 5 años, varios ensayos prospectivos aleatorizados de Fase III compararon estos nuevos fármacos -ipilimumab y vemurafenib con el fármaco existente dacarbazina- observándose mejoras en la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en los pacientes tratados con las nuevas terapias, con un beneficio clínico prolongado, y un aumento de hasta 5 años de supervivencia (9, 10).

Aunque se ha avanzado mucho en investigación, conocimiento y tratamiento del melanoma metastásico cutáneo en los últimos años, el pronóstico de los pacientes portadores de esta enfermedad sigue siendo pobre. En esta monografía se abordarán las bases moleculares de las distintas terapias contra el melanoma metastásico cutáneo, identificando los distintos blancos de los agentes terapéuticos y los eventos y cascadas de señalización que conducen a la muerte

celular y la generación de resistencia. Como mencionamos, el melanoma es una enfermedad de alta incidencia en nuestro país y conocer las bases moleculares de la terapia contra el melanoma es fundamental para la elección de un tratamiento personalizado para el paciente, que conduzca al mejor resultado posible.

Materiales y Métodos

Se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos científicos y revisiones utilizando los buscadores Google Scholar y PubMed. Se utilizaron artículos de revistas que estaban indexadas en PubMed y/o Scielo. No se limitó por año de publicación. Se analizaron además las referencias bibliográficas de los artículos seleccionados con el fin de rescatar otros estudios potencialmente incluíbles en la revisión.

Quimioterapia

Agentes metilantes y mecanismos de reparación del ADN

El melanoma es una neoplasia maligna, por lo tanto las células se encuentran en constante replicación. En estas células las moléculas de ADN están mucho tiempo expuestas, y son especialmente sensibles a la acción de quimioterapéuticos que actúan realizando modificaciones covalentes (11).

Los quimioterápicos de primera línea y los más utilizados en la práctica clínica a nivel mundial en el tratamiento del melanoma son los agentes metilantes DTIC y TMZ (12). En nuestro país, el fármaco más utilizado es DTIC (13). Este es un profármaco que necesita activación por los citocromos P450 (CYP) hepáticos, CYP1A1, CYP1A2 y CYP2E1 (12). En cambio la TMZ (análogo administrable por vía oral de DTIC) se activa espontáneamente en solución acuosa a pH fisiológico. La activación de ambos resulta en la formación del catión metildiazonio (CH_3N_2^+), un potente agente metilante, capaz de metilar al ADN en trece posiciones distintas (12). En términos cuantitativos, el sitio más frecuente de metilación es la posición N7 de la guanina (12). Sin embargo, la posición O6 de la guanina es la principal lesión responsable de la citotoxicidad y el efecto mutagénico de DTIC y TMZ (12) por lo que nos centraremos en los efectos de los quimioterápicos a ese nivel. La adición del grupo metilo en el O6 de la guanina bloquea uno de tres puentes de hidrógeno que establece con la citosina, por lo que la guanina metilada no puede unirse a la citosina. La timina, puede unirse a la guanina metilada por medio de dos puentes de hidrógeno generándose así un error de apareamiento (12). Existen diversos sistemas de reparación de ADN. La proteína O6 metilguanina-DNA-metil-transferasa (MGMT) y el sistema de reparación de mal apareamiento de bases (MMR) son los principales responsables de la reparación y efectos producidos por los agentes metilantes. La proteína

MGMT actúa previo a la replicación del ADN, elimina el grupo metilo de la posición O6 de la guanina y lo une covalentemente a uno de sus propios residuos de cisteína (Cys-145) (14). Luego la MGMT metilada es ubiquitinada y degradada por el proteosoma (11, 14). Una vez eliminado el daño, la célula neoplásica continúa replicándose, por lo que MGMT representa uno de los mecanismos más importantes de resistencia a estos agentes (15). El hallazgo de que altos niveles de MGMT son responsables, al menos en parte, de la resistencia de las células tumorales a la DTIC y TMZ, estimuló intensivos programas de investigación para sintetizar compuestos capaces de inhibir la actividad de MGMT. En la actualidad, dos inhibidores de la enzima MGMT están disponibles para uso clínico, O6-bencilguanina (O6-BG) y O6-(4-bromotencil) guanina (lomeguatrib). El inhibidor O6-BG, se une al sitio activo de MGMT, donde reacciona con la Cys-145, formando S-bencilcisteína y la proteína se inactiva (16). El pretratamiento *in vitro* o *in vivo* con O6-BG de tumores que expresan un alto nivel de MGMT aumenta con frecuencia su sensibilidad a TMZ (15, 17).

Por otro lado, cuando el O6-MeG no puede ser reparado por MGMT se activa el sistema de reparación MMR (12). El MMR está compuesto por varias proteínas, dos de las cuales (MSH2 y MSH6) forman un complejo denominado Muts α . Este complejo detecta y se une a los sitios con bases desapareadas O6MeG/C y O6MeG/T del ADN (15) (Figura 1). Para poder reparar el ADN, el sistema MMR necesita de una hebra madre sana para copiar la secuencia correcta, pudiendo sustituir y reparar el error en la hebra hija, que contiene una base errónea (12). Como la hebra madre contiene el O6MeG, el sistema MMR, tras múltiples intentos fallidos, no logra reparar el error de apareamiento (12). Estos intentos repetidos de reparación MMR defectuosa dan lugar a la formación de lesiones secundarias en el ADN, provocando la ruptura de doble hebra de la hélice del ADN (12, 15). Las células defectuosas en MMR, en particular en Muts α son altamente resistentes a agentes metilantes (12, 18).

Activación de la vía de respuesta al daño en el ADN

El daño en el ADN es reconocido por las proteínas quinasas, ataxia telangiectasia mutado (ATM) y proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3 (ATR) (19). ATM y ATR se activan, autofosforilan y fosforilan múltiples sustratos proteicos; están implicadas en el cese del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la senescencia celular (19). Una de sus primeras respuestas a la ruptura de doble hebra de la hélice del ADN es la fosforilación de la histona H2AX (20). Además, entre sus sustratos, se destacan la quinasa 1 reguladora del ciclo celular (CHK1) y quinasa de punto de control 2 (CHK2), que son fosforiladas y activadas por ATR y ATM, respectivamente (7, 19, 21, 22) (Figura 1).

CHK1 Y CHK2 regulan los puntos de control del ciclo celular G1/S y G2/M mediante varios mecanismos. Estas quinasas fosforilan a la fosfatasa del ciclo de división celular Cdc25A y promueven su ubiquitinación y degradación por el proteosoma. Este evento impide la desfosforilación y activación de la quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2), necesaria para la progresión de fase de G1 a S (23). Los mecanismos moleculares, dependientes de CHK2 y CHK1, para la detención de G2/M son similares a los de G1/S. En este caso, las quinasas fosforilan a Cdc25C necesaria para la progresión de esta fase (7, 23) (Figura 1).

Por otro lado, p53 es fosforilado por la vía ATM-CHK2 y ATR-CHK1 (15, 21). ATM fosforila además a la proteína E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (24). En su estado fosforilado, p53 se acumula ya que se separa de la proteína Mdm2, que normalmente cataliza la ubiquitinación de p53 y promueve su degradación (24). En el núcleo, p53 actúa como factor de transcripción, promoviendo la expresión de genes que participan en la respuesta al daño al ADN. Entre ellos p21, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, que conduce a la detención del ciclo celular en de la transición G1/S (15, 24) (Figura 1). El aumento en los niveles de p53 también conduce a la apoptosis y/o la senescencia celular.

Apoptosis inducida por quimioterapia

La apoptosis es considerada el mecanismo principal de muerte celular inducida por la quimioterapia, por esto las vías que regulan la apoptosis son el foco de muchas investigaciones preclínicas para el descubrimiento de fármacos (25). Se encuentran descritas dos vías de activación de la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía intrínseca se activa generalmente en respuesta a señales de estrés intracelular, entre ellas se encuentra el daño al ADN (26).

La vía intrínseca está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2: las proteínas pro-apoptóticas (ej. Bax, Bak, Bad) y las anti-apoptóticas (ej. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) (27). Las proteínas anti-apoptóticas evitan la inducción de la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo c hacia el citoplasma; mientras que, las proteínas pro-apoptóticas actúan promoviendo la liberación de citocromo c (27). En el citoplasma el citocromo c se une al factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), que recluta a la pro-caspasa-9, promoviendo su auto-activación y la formación del complejo conocido como apoptosoma (27, 28). La caspasa 9 es la caspasa iniciadora en esta vía y activa a las caspasas 3,6 y 7. Éstas catalizan una serie de eventos proteolíticos que culmina en la muerte celular con formación de cuerpos apoptóticos, fragmentación del ADN, condensación de la cromatina (26, 27) (Figura 1).

P53 activa la vía apoptótica intrínseca promoviendo la expresión de genes de proteínas proapoptóticas, como Apaf-1, PUMA, Noxa, Bax; y la represión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 (25). En el melanoma, se ha observado que la quimioterapia activa la vía apoptótica intrínseca dependiente de p53 (15).

Se ha observado que la apoptosis por TMZ en las células de glioma involucra también a la vía extrínseca Fas/CD95/Apo-1 (29). Sin embargo, las células del melanoma son refractarias a la apoptosis inducida por la vía extrínseca. Esto se debe al silenciamiento de la procaspasa-8 en estas células. De hecho, en células de melanoma con p53 de tipo salvaje el IFN-β induce la expresión de la procaspasa-8 y, de este modo, reactiva la vía apoptótica Fas/CD95/Apo-1 y sensibiliza a las células de melanoma a la acción de TMZ (30).

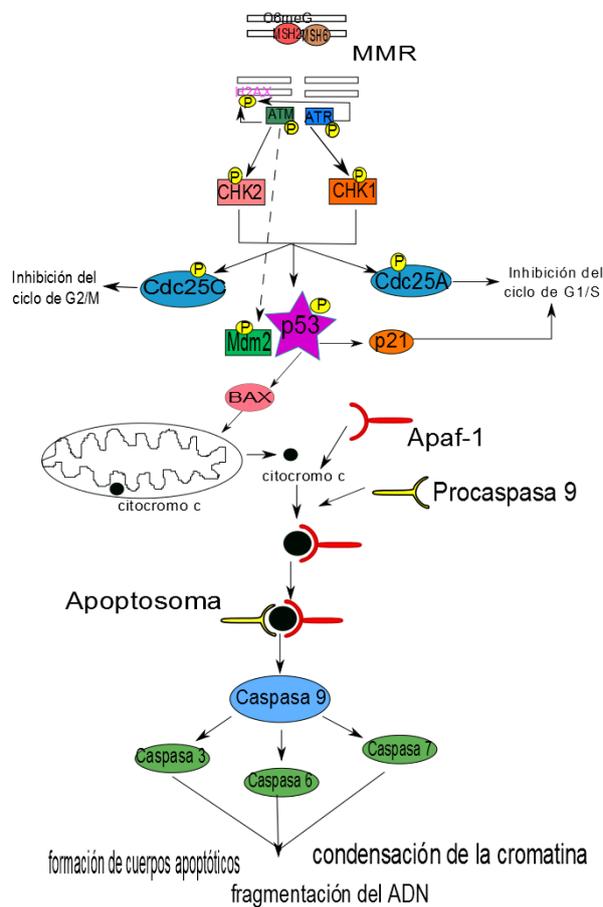


Figura 1: Activación de la vía de respuesta al daño en el ADN y de la apoptótica inducida por DTIC Y TMZ.

Senescencia inducida por quimioterapia

Como fue mencionado anteriormente, la exposición a agentes quimioterápicos también puede inducir la senescencia celular (31). La senescencia es un estadio caracterizado por la inhibición irreversible de proliferación, el aumento en la actividad β -galactosidasa, cambios morfológicos (células agrandadas, aplastadas y multinucleadas) y en muchos casos la secreción de factores pro-inflamatorios (32). Las investigaciones actuales sugieren que la senescencia inducida por terapia puede afectar el resultado de la terapia contra el cáncer (32). La TMZ puede inducir la senescencia, en las células de melanoma y conducir a la detención del ciclo celular dependiente de p53 y p21 en las células con p53 de tipo salvaje (33).

La decisión celular entre la apoptosis y la senescencia depende en parte de la magnitud del estrés al que se exponen las células cancerosas. Niveles bajos de daño en el ADN suelen desencadenar respuestas anti-proliferativas asociadas a la senescencia, pero sin llegar a activar la apoptosis (34).

Efectividad y efectos adversos

Se ha demostrado en diversas investigaciones que la monoterapia con estos fármacos no es muy efectiva, mostrando una baja sobrevida a largo plazo. Sin embargo los agentes metilantes todavía se consideran fármacos de referencia, aunque las respuestas favorables se producen en menos del 5% de los casos (7). Además la quimioterapia está asociada a múltiples efectos adversos tales como: náuseas, vómitos, mielosupresión y toxicidad hepática (12).

Terapias dirigidas

Vía de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La vía de las MAPK es un sistema de transmisión de señales que en condiciones fisiológicas promueve el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular (35). Se activa por la unión de factores de crecimiento o mitógenos, señales extracelulares que actúan induciendo la mitosis y la división celular, a los receptores tirosin quinasa (RTK). Esto conduce a la autofosforilación, en residuos de tirosina, de estos receptores que a su vez unen a dos proteínas adaptadoras, la proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento (GRB2) y el intercambiador de nucleótidos de guanina SOS, y conducen a la activación de la GTPasa Ras (RAS) (36, 37) (Figura 2). RAS pertenece a la familia de las proteínas G monoméricas y

presenta las isoformas: H-RAS, K-RAS, N-RAS (35). RAS une nucleótidos de guanina y alterna entre dos estados, inactivo unido a GDP y activo unido a GTP. El pasaje al estado inactivo está regulado por la proteína activadora de la GTPasa (GAP), que aumenta la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP, conduciendo a la inactivación de RAS. En su estado activo RAS se une y provoca cambios conformacionales en la primera proteína quinasa de la vía, la proteína protooncogénica RAF, activándola (36, 37). Esta última presenta tres isoformas, A-RAF, B-RAF y C-RAF (35). A continuación, la proteína RAF fosforila y activa a la quinasa activadora de ERK (MEK), quien presenta dos isoformas, MEK1 promotor de la proliferación celular y MEK2 inductor de la diferenciación celular. Finalmente, MEK activa a la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), última quinasa de la vía, responsable de ingresar al núcleo y fosforilar varios factores de transcripción tales como c-Jun y c-Fos. Estos dos factores forman un complejo llamado AP1, que se une al ADN y regula la expresión de la ciclina D1 y de inhibidores de las CDK, como p21, p19 y p16, promoviendo la progresión del ciclo celular (38) (Figura 2).

Entre los sustratos de ERK se encuentra también la quinasa ribosomal S6 (RSK), uno de los primeros identificados (39). Esta proteína presenta cuatro isoformas y entre sus funciones se destaca la promoción de la supervivencia celular a través de la fosforilación y la inactivación de la proteína pro-apoptótica Bad (39, 40) (Figura 2). Bad en su estado activo está desfosforilada y promueve la apoptosis celular, mientras que la fosforilación de por lo menos uno de sus tres residuos de serina la inactiva (Ser75, Ser99 o Ser118) (41).

Las mutaciones en la vía de las MAPK cumplen un rol fundamental en el desarrollo y crecimiento del melanoma. Esta vía está implicada en la supervivencia de las células tumorales y su inactivación conduce a la apoptosis (41). Cerca del 50% de los melanomas cutáneos presentan mutaciones en esta vía, correspondiendo el 60% de ellas a B-RAF, el 20% a N-RAS y el 4% al receptor c-KIT (42, 43). Además, se han documentado mutaciones a nivel de MEK1/2 simultáneamente con las ocurridas en B-RAF o N-RAS, siendo las más frecuentes, MEK1 P124S y MEK1 E203K (43). Respecto a las mutaciones en B-RAF, la más frecuente consiste en la sustitución de ácido glutámico por valina en el codón 600 (V600E), o en la sustitución de valina por lisina en el mismo codón (V600K) (42). Estas mutaciones resultan en una activación constitutiva de la quinasa B-RAF, es decir su activación en ausencia de estímulos externos como factores de crecimiento, y por tanto de la vía. En lo que respecta a RAS, las mutaciones más frecuentes ocurren en N-RAS (10-25%) y el 2% en H-RAS y K-RAS (44, 45). La mayoría de las mutaciones de N-RAS se detectan en el codón 61 y con menor frecuencia en el codón 12 o 13 (44). Las mutaciones en N-RAS y B-RAF parecen ser mutuamente excluyentes, observándose juntas en menos del 1% de los pacientes (46). Por

último las mutaciones en C-KIT se han observado en diferentes exones; y generalmente están presentes en melanomas acrales, de mucosas (47).

Todas estas mutaciones descritas causan la activación permanente de la vía, lo que en principio debería conducir a la proliferación continua de los melanocitos. Sin embargo, la proliferación celular desencadenada por una mutación aislada en una de estas proteínas induce la senescencia celular, en un proceso conocido como senescencia inducida por oncogén (OIS). En concreto, la activación de la vía de las MAPK desencadenada por la mutación de B-RAF conduce a un aumento en la expresión del inhibidor de CDK2, p16 y con esto a la inhibición del ciclo celular (48). Esto se observa claramente en los nevos melanocíticos, donde se encuentran células senescentes y la proliferación celular está detenida. Para que se produzca una progresión hasta melanoma debe añadirse una mutación adicional en un gen supresor de tumores que permita la evasión de la senescencia. Entre estos genes se destacan, el gen CDKN2A y el gen homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (46, 49).

Bases moleculares de la terapia dirigida

El principal objetivo de las terapias dirigidas en el melanoma es inhibir la vía de las MAPK, que se encuentra activa de forma constitutiva. Esto se lleva a cabo inhibiendo distintos componentes de la vía, responsables de la progresión y supervivencia de las células de melanoma (Figura 2). Uno de los grupos farmacológicos más utilizados son los inhibidores de B-RAF. El desarrollo de estos inhibidores surge a partir del descubrimiento del fármaco sorafenib, originalmente diseñado como inhibidor de C-RAF (50). Aunque este fármaco tiene alta preferencia por C-RAF, también inhibe débilmente a B-RAF V600E (50). Varios estudio Fase I, Fase II e incluso en Fase III en pacientes con melanoma no revelaron ninguna eficacia clínica. Esto puede explicarse porque los pacientes no fueron seleccionados para mutaciones B-RAF y aproximadamente solo la mitad de ellos tenían melanomas con mutaciones V600E (50).

Posteriormente surge un nuevo fármaco, el Vemurafenib, un inhibidor de B-RAF mutado (Figura 2). Este fármaco actúa como un inhibidor reversible, que se une a un sitio que se superpone con el sitio de unión al ATP de B-RAF mutado (51, 52). El Vemurafenib, presenta actividad a concentraciones nanomolares contra las líneas celulares con la mutación B-RAF y un IC50 (concentración de fármaco necesaria para la inhibición del 50% del crecimiento) 50 veces más alto respecto a B-RAF de tipo salvaje (53). En cuanto al efecto de Vemurafenib sobre las células de melanoma que expresan B-RAF V600E, conduce tanto a la apoptosis como a la senescencia (54). La inducción de la apoptosis es el efecto preferido del tratamiento farmacológico en el cáncer, mientras que los efectos de la senescencia son aun controversiales, pudiendo ser considerada un objetivo de tratamiento elegible o no (55).

Entre los efectos adversos más frecuentes con el uso de vemurafenib se encuentran fatiga, artralgia, erosión cutánea, fotosensibilidad, edema, náuseas, alopecia y prurito. Los efectos adversos más comunes grado 3 fueron carcinomas de células escamosas cutáneas y erupción cutánea. El carcinoma de células escamosas cutáneas y los queratoacantomas, que a menudo contienen mutaciones RAS, se producen en aproximadamente el 20% de los pacientes, usualmente en los primeros 2-3 meses de tratamiento, y se tratan por simple escisión (42).

Para conocer la eficacia terapéutica del fármaco se desarrolló un estudio de fase III, donde se comparó vemurafenib contra DTIC en pacientes que tenían melanoma metastásico con la mutación B-RAF V600E y que previamente no habían sido tratados. Vemurafenib mostró beneficios en la tasa de respuesta global (48% vs. 5%), en la supervivencia global a 6 meses (84% vs. 64%) y en la supervivencia libre de progresión (5,3 meses vs. 1,6 meses). Estos resultados, llevan a la aprobación del fármaco por la FDA en 2011 (42, 56).

Otro de los fármacos que integra el grupo de los inhibidores de B-RAF es dabrafenib (Figura 2). El mismo inhibe de forma competitiva y reversible la unión del ATP a su sitio activo. Inhibe el 50% de la actividad quinasa de B-RAF V600E con una concentración cinco veces menor que la requerida para inhibir B-RAF de tipo salvaje (57). Al igual que para vemurafenib, es de gran importancia confirmar la presencia de la mutación B-RAF V600E previo a la administración del fármaco (58). Presenta un perfil de seguridad similar al vemurafenib, aunque dabrafenib mostró una menor tasa de carcinomas cutáneos de células escamosas (18-25% en ensayos de vemurafenib vs. 6-11% en dabrafenib) (59). Además, este fármaco es eficaz en el tratamiento de las metástasis cerebrales (42). Dabrafenib fue aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico con la mutación B-RAF V600E en 2013. Esto se apoyó en los resultados de un estudio de fase III en pacientes con melanoma irresecable en estadio III o IV, en donde dabrafenib frente a dacarbazina mostró un incremento de la supervivencia libre de progresión (5,1 meses vs 2,7 meses) (56).

El otro grupo farmacológico dentro de las terapias dirigidas está compuesto por los inhibidores de MEK. En modelos preclínicos, las células con mutaciones de B-RAF se asociaron con mayor sensibilidad a los inhibidores MEK que las B-RAF salvaje (60). Dentro de este grupo describiremos las acciones del fármaco trametinib (Figura 2). El mismo se une a MEK 1/2 en un sitio adyacente al sitio de unión de ATP, y es considerado un inhibidor no competitivo y alostérico (61).

Experimentos preclínicos demostraron la amplia actividad anticancerígena de este fármaco en modelos celulares y animales, induciendo la detención del ciclo celular, la apoptosis y la inhibición del crecimiento *in vitro* e *in vivo*, especialmente en células cancerosas con mutaciones activadoras de B-RAF y K-RAS (62).

Entre sus efectos adversos se destaca la toxicidad cutánea, principalmente erupción papulopustular. Sin embargo, no se ha observado carcinoma de células cutáneas escamosas durante el tratamiento con trametinib (63). Otros menos frecuentes pero significativos incluyeron una disminución en la fracción de eyección cardíaca, disfunción ventricular, alteraciones visuales y enfermedad pulmonar intersticial (42). Actualmente, el trametinib no está indicado en pacientes que han sido tratados previamente con inhibidores B-RAF (42). Se vió que trametinib radiosensibiliza a células de melanoma con mutaciones RAS/RAF induciendo la detención prolongada en G1 y senescencia prematura. Además se ha demostrado que la combinación de este fármaco y la radioterapia es bien tolerada y reduce el crecimiento tumoral *in vivo* (64).

En un estudio de fase III se demostraron los beneficios del trametinib en contraste con la quimioterapia (dacarbazina o paclitaxel), en la sobrevida libre de progresión (4,8 meses vs. 1,5 meses) y en la supervivencia global a los 6 meses (81% vs 67%). Tras haber demostrado esto, la FDA en 2013 aprobó el primer inhibidor MEK en monoterapia para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado con la mutación B-RAF V600E/K (56).

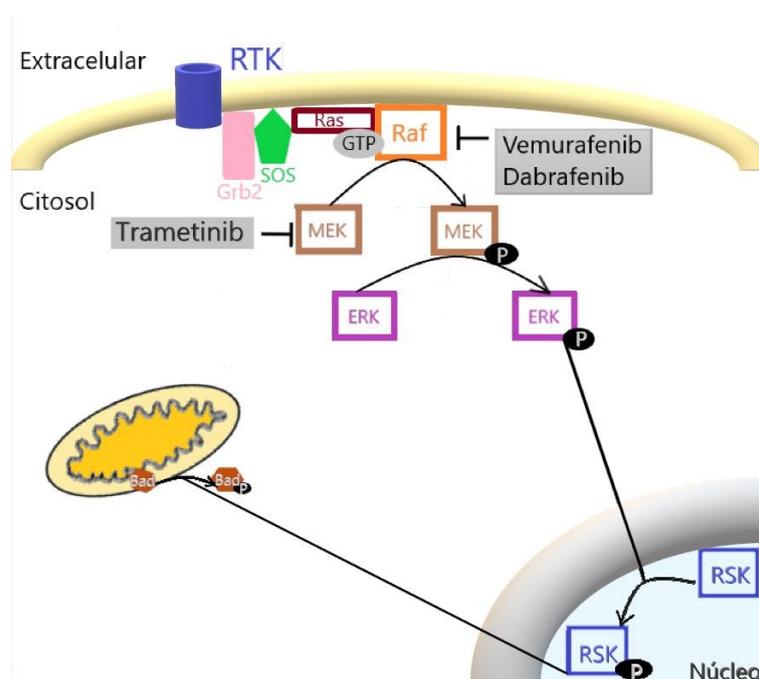


Figura 2: Activación de la vía de las MAPK y sitios de acción de las terapias dirigidas.

Mecanismos de resistencia y terapias combinadas

Un problema muy importante con los inhibidores de B-RAF y MEK es que la duración de su respuesta es corta, debido a que el tumor desarrolla mecanismos de resistencia, que aparecen a los 6-7 meses de iniciado el tratamiento (36, 65).

Los mecanismos de resistencia pueden dividirse en dependientes e independientes de MAPK. En el primer grupo se han descrito mutaciones en el oncogén diana que resultan en la amplificación génica y la anulación de los efectos de la dosificación terapéutica estándar (66). También se describen la sustitución de B-RAF por C-RAF, resultando en la reactivación de la vía MAPK (67). Otra de las mutaciones que se han encontrado es la de MEK 1-C121S, que confiere resistencia a vemurafenib y a los inhibidores MEK (66). Por otra parte, la sobreexpresión de la quinasa COT (oncogén cancer Osaka Tiroidea) que activa a ERK de una manera independiente de RAF, confiriendo resistencia a los inhibidores de RAF (65).

Una estrategia planteada para superar alguna de estas resistencias es bloquear la vía de la MAPK a diferentes niveles utilizando una combinación de fármacos. Inhibiendo B-RAF y MEK a la vez por medio del empleo de dabrafenib y trametinib, se han logrado, en estudios en fase I y II, respuestas superiores comparadas con la monoterapia con inhibidores de B-RAF, con una tasa de respuesta superior (76 vs 54%) y mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad (9.4 vs 5.8 meses) (63). En cuanto a los efectos adversos se observó carcinoma cutáneo de células escamosas en el 7% de los pacientes que recibieron terapia combinada, en comparación con el 19% que recibieron monoterapia con dabrafenib, mientras que la pirexia fue más común en el grupo de combinación. Este estudio demostró que dabrafenib y trametinib podrían combinarse de forma segura, logrando un mejor resultado clínico y menor toxicidad (63).

Inmunoterapias

Muchas son las funciones del sistema inmune, una de ellas es en relación al cáncer. El sistema inmune es capaz de reconocer células tumorales y así eliminarlas, sin embargo, en algunos casos el sistema inmune no es suficientemente efectivo y da como resultado el desarrollo de un tumor. De esto surge el concepto de "vigilancia inmunológica" que postula que el organismo está continuamente generando células malignas, pero estas son rápidamente destruidas por el sistema inmune (68). Aún con la presencia de inmunovigilancia, las células tumorales presentan

mecanismos de evasión tumoral que les permiten proliferar sin ser reconocidas ni eliminadas por el sistema inmune. Algunos de estos mecanismos son: escasa inmunogenicidad de los antígenos tumorales, crecimiento excesivo del tumor que supera la velocidad de respuesta del sistema inmune, ausencia o enmascaramiento de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y aumento de factores que inhiben la activación de la respuesta inmune (69), por ejemplo actuando sobre puntos de control del sistema inmune.

En la respuesta inmune tumoral participan diversas poblaciones de linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$), linfocitos B, células asesinas (NK, del inglés natural killer), macrófagos, células dendríticas así como factores solubles (citoquinas y anticuerpos), receptores y moléculas accesorias. Otras moléculas importantes para el reconocimiento del tumor son las moléculas de MHC, el receptor de linfocitos T (TCR), las moléculas de adhesión y los antígenos tumorales. Existen dos clases de MHC (68). Las moléculas de MHC de clase I son glicoproteínas de membrana presentes en casi todas las células nucleadas y tienen como función la presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$), mientras que las moléculas de MHC de clase II sólo se expresan en células presentadoras de antígenos (APC) (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B) y presentan los antígenos a los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) (70). Para que un antígeno sea reconocido, primero debe ser degradado a péptidos más pequeños en el interior de las APC, que luego son expuestos en la superficie de éstas (en el seno de las moléculas de MHC) para posteriormente ser reconocidos por su correspondiente linfocito T (71).

El TCR se encuentra unido a una molécula de membrana denominada CD3. Su función consiste en reconocer al complejo MHC/antígeno, activándose y generando así el primer paso para la activación del linfocito T (71). Los principales antígenos tumorales descritos en el melanoma son los MAGE (antígenos tumor-específicos, encontrados tanto en melanoma como en otros tipos de cánceres, pero no en células normales) y los antígenos MART-1/Melan A, gp100 y tirosinasa (denominados antígenos asociados al tipo de tejido) (72).

El principal mecanismo de la inmunidad antitumoral es la destrucción de las células tumorales por los linfocitos T $CD8^+$, como dijimos anteriormente, reconocido por el complejo antígeno/MHC clase I. La función antitumoral del linfocito T $CD4^+$ involucra la producción de citoquinas como factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón gamma ($IFN-\gamma$). La importancia del sistema inmune para reconocer y eliminar a las células tumorales ha sido la clave para el desarrollo de terapias basadas en la activación de los distintos componentes del sistema inmune para combatir al cáncer (71).

El melanoma es considerado un cáncer inmunogénico ya que es un potente activador del sistema inmune. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, presenta mecanismos de evasión tumoral, alguno de los cuales actúan sobre puntos de control del sistema inmune, vías de señalización responsables de inhibir a los linfocitos T. En los últimos tiempos se han generado terapias capaces de inhibir estos puntos de control con el objetivo de activar al sistema inmune y así poder atacar al tumor más eficientemente. Las diferentes inmunoterapias actúan sobre las vías de activación específicas, señales co-estimuladoras e inhibitoras de los linfocitos T (73).

Activación de los linfocitos T

La activación de los linfocitos T comienza con la primera señal, proporcionada por la interacción del complejo MHC-antígeno presentes en las APC con el TCR. La interacción del TCR con el complejo MHC-antígeno permite la unión de CD4 o CD8 a la molécula de MHC de clase II o clase I respectivamente (73). Ésta unión permite la activación de la tirosina quinasa específica de leucocitos (Lck) la que fosforila a los residuos de tirosina presentes en los motivos de activación basado en tirosina (ITAM) de CD3 (proteína asociada al TCR). Estas tirosinas fosforiladas son sitios de anclaje para la tirosina quinasa asociada a la cadena ζ (ZAP-70). Una vez activada ZAP-70, es capaz de fosforilar varias moléculas adaptadoras, dentro de ellas el estabilizador de células T activadas (LAT) y la proteína específica de leucocitos que contiene SH2 (SLP-76) (74). La activación de LAT permite que se unan a ésta otras moléculas adaptadoras como la proteína oncogénica vav (VAV), proteína citoplasmática (NCK), la proteína adaptadora GADS y la fosfolipasa-c γ (PLC- γ). Por otro lado, la activación de SLP-76 permite la activación de la GTPasa Ras (RAS). Estos eventos conducen a la activación de tres cascadas de señalización (75).

La PLC- γ cataliza la escisión del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) en inositol 3-fosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) y activa a dos vías de señalización. Por un lado, IP₃ induce la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares. En el citosol, el calcio forma un complejo con la calmodulina, induciendo la activación de la calcineurina que desfosforila al factor de transcripción NFAT, permitiendo su translocación al núcleo donde promueve la transcripción de genes de las interleuquinas IL-2 e IL-4, entre otros (76). Por otra parte, DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) que conduce a la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), que promueve la transcripción de genes de varias citoquinas (IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8) (74). La tercer vía de señalización está dada por la activación de la proteína RAS por SLP-76 y conduce a la activación de la vía de las MAPK en los linfocitos T (71).

La segunda señal para la activación de los linfocitos T requiere de moléculas co-estimuladoras y es esencial para la correcta activación de los linfocitos T. En caso de no contar con ésta segunda señal, los linfocitos T entran en estado de anergia y mueren. Los co-estimuladores son la molécula CD28, expresada en la superficie de los linfocitos T y su receptor B7 que se encuentra en las APC (73). CD28 es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas presente en la superficie de los linfocitos T. Se expresa en aproximadamente el 80% de los linfocitos T CD4⁺ y 50% de los linfocitos T CD8⁺ (74). A pesar de no tener actividad enzimática intrínseca, la cola citoplasmática de CD28 contiene motivos de señalización basados en tirosina que se fosforilan en respuesta a la activación del TCR y se unen proteínas con motivos SH2 (77). Esto es crucial para la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que se encuentra asociada a la cola citoplasmática de CD28. La PI3K activada convierte a PIP2 en fosfatidil inositol- trifosfato (PIP3), que promueve la fosforilación y activación de la proteína quinasa AKT por la proteína dependiente de 3-fosfatidilinositol, PDK1 (Figura 3) (78). AKT es una molécula crucial en la respuesta inmune mediada por los linfocitos T; regula numerosas funciones fisiológicas como la supervivencia y proliferación celular, la reorganización del citoesqueleto, la apoptosis y el metabolismo de la glucosa, entre otras. AKT inactiva varios factores proapoptóticos como BAD y procaspasa-9; además de factores de transcripción FKHR, también conocido como FOXO1. Por otra parte, AKT activa factores de transcripción que incrementan la expresión de genes anti-apoptóticos, incluyendo la proteína de unión a elementos de respuesta a AMP-cíclico (CREB). Otro efecto importante de AKT, para favorecer la supervivencia celular, es la inactivación del gen supresor de tumor, p53 (79). Todas estas funciones crean un balance anti-apoptótico favoreciendo la proliferación y supervivencia célula (Figura 3) (79) .

Inhibición de los linfocitos T

Existen receptores y ligandos que actúan como reguladores negativos de la activación de los linfocitos T. Estos puntos de control del sistema inmune tienen el propósito de mantener la autotolerancia inmunitaria previniendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes y de limitar el daño colateral de los tejidos durante las respuestas inmunes frente a patógenos. Las moléculas mayormente estudiadas son el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1).

CTLA-4 es una inmunoglobulina expresada en los linfocitos T activados. CTLA-4 se encuentra en la misma región cromosómica que CD28. A diferencia de CD28, que se expresa constitutivamente en el linfocito, en ausencia de estimulación CTLA-4 está presente a niveles muy bajos en la superficie celular, y sus niveles se elevan a medida que el linfocito T se activa. Los niveles de CTLA-4 están regulados por dos mecanismos: la redistribución de las moléculas

de CTLA-4, que se encuentran en el citosol, hacia la membrana plasmática; y el incremento de su expresión génica y síntesis (80).

Se han propuesto dos mecanismos de acción principales para el CTLA-4 que median la inhibición de los linfocitos T: la señalización negativa mediada por el dominio intracitoplasmático y el antagonismo competitivo con CD28 (75). El primero involucra la presencia de la proteína fosfatasa 2 (PP2A), una molécula crucial para la inhibición de los linfocitos T mediada por CTLA-4. Dicha proteína está asociada a la cola citoplasmática de CTLA-4. La activación de los linfocitos T induce la fosforilación de la subunidad A de la PP2A con la consiguiente disociación de la molécula de CTLA-4 (81). Liberada la PP2A, ésta es capaz de desfosforilar a la AKT y así inhibir su función, mediando así la inhibición de las señales co-estimuladoras mediadas por CD28 (Figura 3). El segundo mecanismo propuesto es el antagonismo competitivo mediado por CD28. CTLA-4 y CD28 presentan similitud génica estructural y comparten el mismo ligando B7, aunque CTLA-4 se une al mismo con mayor afinidad (82). Esta propiedad de CTLA-4, en relación con CD28, se debe en gran parte a la estructura de homodímero de CTLA-4, que le permite unirse bivalentemente a B7, mientras CD28 sólo puede unirse monovalentemente a B7 (83). Además como se mencionó anteriormente, la activación de los linfocitos T conduce a un aumento de la expresión de CTLA-4 en la superficie celular donde se encontrará disponible para competir con CD28 por el ligando B7 (83).

La segunda molécula involucrada en el control negativo de la activación de los linfocitos T es PD-1. PD-1 es una proteína transmembrana monomérica de la superfamilia de las inmunoglobulinas ubicada en la superficie de los linfocitos T (82). En su dominio citosólico, PD-1 contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) (84), y un motivo de cambio de inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM), también presente en su cola citoplasmática (84). Ambos motivos están involucrados en la transmisión de señales inhibitorias.

Tras la estimulación de TCR y de la interacción con sus ligandos (PD-L1 o PD-L2), PD-1 experimenta fosforilación de los residuos de tirosina en sus dominios ITIM e ITSM de la cola citoplasmática. La fosforilación de ITIM permite el reclutamiento de las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 que desfosforilan a sus blancos interrumpiendo las señales activadoras generadas por el TCR y CD28. En particular a la inactivación de la PDK, y evita la activación de AKT (84). Estudios han demostrado que el motivo ITSM es necesario para la función inhibidora de PD-1, no siendo del todo clara la función de los motivos ITIM (83). La inactivación de AKT inhibe la inducción del regulador antiapoptótico Bcl-x1 (83), el consumo de glucosa, la producción de citoquinas, afectando la proliferación y la supervivencia celular (Figura 3).

PD-1 se expresa mínimamente en células en reposo del sistema inmune: células T doble negativas (CD4- CD8-), sin embargo, tras la activación de las mismas, PD-1 se encuentra ampliamente expresado en células T, células B, células NK, células NKT, células dendríticas y macrófagos. Su transcripción en células T requiere la translocación al núcleo de factor de transcripción NFAT, y la unión al promotor del gen PDCD1, que codifica a PD-1 (85). Su expresión se ve aumentada por la presencia de un entorno proinflamatorio (85). Los ligandos PD-L1 y PD-L2, miembros de la familia B7 (82), poseen diferentes niveles de expresión en los tejidos. PD-L2 se expresa en células dendríticas y macrófagos y PD-L1 se expresa constitutivamente a bajos niveles en las APC, células endoteliales, islotes pancreáticos y también en células tumorales (86). La interacción entre PD-1 y sus ligandos, PD-L1/PD-L2 restringe la función de las células T.

Los mecanismos moleculares explicados anteriormente, y el reciente estudio de CTLA-4 y PD-1 como principales puntos de control inmunológico ha permitido postular diferentes terapias basadas en su inhibición con el objetivo de estimular el sistema inmune y así poner en marcha la respuesta inmune antitumoral.

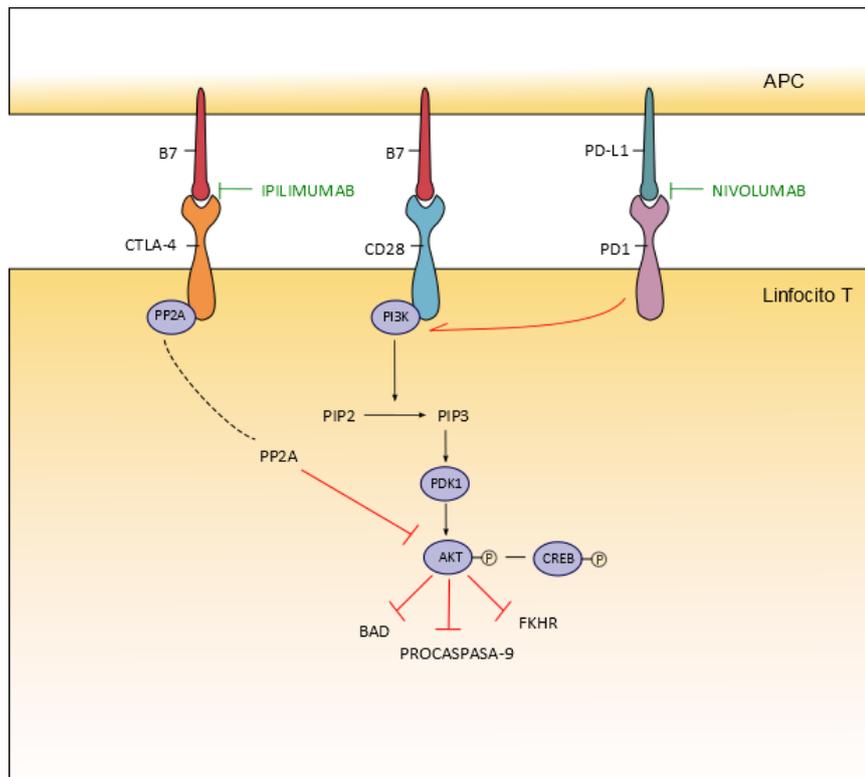


Figura 3: Co-estimuladores positivos y negativos de los linfocitos T. Sitio de acción de los fármacos.

Efectividad y efectos adversos

El primer tratamiento inmunoterapico aprobado para el melanoma fue la IL-2 el cual demostró en un estudio, una respuesta objetiva en el 16% en los pacientes tratados con altas dosis de IL-2 (87). Sin embargo, su uso fue desalentado por los graves y frecuentes eventos adversos relacionados a su tratamiento (8), y por el descubrimiento de las nuevas terapias inmunológicas basadas en los puntos de control del sistema inmune.

El ipilimumab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA en el 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico estadio III-IV (88). Es un anticuerpo monoclonal IgG anti CTLA-4 totalmente humano. Su mecanismo de acción consiste en la unión del anticuerpo a CTLA-4 impidiendo así la unión a su ligando B7, bloqueando su respuesta moduladora negativa, llevando a un aumento en la respuesta inmune contra las células tumorales (89) (Figura 3). Su uso, eficacia y seguridad fueron demostrados en un estudio aleatorizado, doble ciego que incluyó 676 pacientes. Éste estudio demostró que la supervivencia global se veía aumentada significativamente en pacientes que recibieron ipilimumab versus glicoproteína gp100 (10,1 frente a 6,4 meses) (88). El ipilimumab presenta una gran eficacia contra el melanoma metastásico. Sin embargo, el uso de ipilimumab causa no sólo un incremento de la respuesta inmune antitumoral sino una respuesta generalizada, observándose una amplia gama de efectos adversos mediados por el sistema inmune (90). Se registró una incidencia global de efectos adversos del 72% de los pacientes tratados con ipilimumab, siendo los más frecuentes dermatitis, colitis, hepatitis, hipofisitis y tiroiditis. En estudios clínicos, aproximadamente el 26% de los pacientes han experimentado eventos adversos graves (\geq grado 3), incluyendo diarrea/colitis, erupción cutánea, hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipofisitis e insuficiencia suprarrenal (91).

Entre los fármacos que inhiben a PD-1 se destaca nivolumab (anticuerpo monoclonal humano de tipo inmunoglobulina G4), aprobado por la FDA en el 2014 (92). Éste se une a PD-1 y bloquea su interacción con PD-L1 y PD-L2 generando así una actividad antitumoral indirecta, que tiene como fin aumentar la actividad del sistema inmune frente al melanoma (42) (Figura 3). Está indicado para el tratamiento del melanoma avanzado tanto en monoterapia, como en combinación con ipilimumab. Se prefiere esta última modalidad ya que en diversos estudios se ha visto que genera un mayor aumento de la supervivencia libre de progresión, en pacientes con baja expresión de PD-L1 en el tumor, en comparación con la monoterapia (93).

Las reacciones adversas más frecuentes son fatiga, erupción cutánea, prurito, diarrea y nauseas siendo la mayoría de las reacciones adversas encontradas leves o moderadas (grado 1 o 2). De los pacientes tratados en los estudios, un 12% presentó al menos un efecto adverso grave, de grado 3-4 (94). Dichos ensayos concluyeron que el fármaco es un agente efectivo y seguro para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico o irreseccable en pacientes previamente

tratados con ipilimumab, o en pacientes con la mutación BRAF V600 luego de haber sido tratados con inhibidores de BRAF (92).

La reciente aprobación de nivolumab como segunda línea de tratamiento en melanomas sin mutación BRAF o con mutación BRAF (que han progresado luego de la terapia de primera línea) ha revolucionado el tratamiento del melanoma. nivolumab presenta una actividad clínica similar a ipilimumab independientemente del estado de mutación BRAF además de una mejora significativa en la supervivencia global y la tasa de respuesta (95).

Otro de los fármacos destacados en la inhibición de PD-1 es el pembrolizumab, otro anticuerpo IgG4 humanizado, de alta selectividad. El mismo fue probado por la FDA en setiembre de 2014 (96). Se estudió su eficacia en estudios de fase III aleatorizados, en pacientes previamente tratados con ipilimumab o que no habían recibido tratamiento previo. Los mismos demostraron que la tasa de supervivencia anual fue de un 67% (63% para los tratados con ipilimumab y 71% para los que no habían sido tratados con anterioridad). Y una tasa de supervivencia a los 2 años de un 50% (97). Se evidenció que los efectos adversos no son exclusivos del fármaco y son comunes a los de su especie. Dentro de los mismos destacamos fatiga, diarrea, erupción cutánea y náuseas. Los efectos inmunomediados también resultaron ser los mismos, tales como colitis, hepatitis, dermatitis atópica, entre otros (96).

Conclusiones

Luego del análisis bibliográfico realizado para esta revisión, llegamos a la conclusión de que en esta última década han habido grandes avances con respecto al tratamiento del melanoma metastásico cutáneo. Las nuevas terapias han mejorado significativamente la sobrevida y los periodos libres de enfermedad. Sin embargo el melanoma metastásico cutáneo sigue siendo un cáncer de mal pronóstico y sigue estando en continua investigación su tratamiento. Estudiar individualmente cada paciente con el objetivo de descubrir mutaciones genéticas puntuales causantes de la enfermedad y de la evasión de ciertos tratamientos, sería la conducta ideal para lograr un tratamiento óptimo con mejores tasas de sobrevida. En nuestro país el tratamiento más usado es la quimioterapia, conocer e informarnos sobre inmunoterapias y terapias dirigidas es el paso inicial para poder brindar tratamientos con tasas de supervivencia más esperanzadora.

Bibliografía

1. Schadendorf D, Hauschild A. Melanoma in 2013: Melanoma--the run of success continues. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(2):75-6.
2. Barrios E, Garau M. IV ATLAS DE INCIDENCIA DEL CANCER EN EL URUGUAY Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer- Registro Nacional del Cáncer2014 [80-1]. Available from: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_394_1.html.
3. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
4. de la Fuente A, Ocampo J. Melanoma cutáneo. *Gac Méd Méx*. 2010;126-35.
5. Hausauer AK, Swetter SM, Cockburn MG, Clarke CA. Increases in melanoma among adolescent girls and young women in California: trends by socioeconomic status and UV radiation exposure. *Arch Dermatol*. 2011;147(7):783-9.
6. Díaz Molina VL, Peniche Castellanos A, Fierro Arias L, Ponce Olivera RM. La inmunoterapia en el melanoma maligno: revisión. *Dermatología, Cosmética, médica y quirúrgica*2012. p. 123-38.
7. Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(12):656-66.
8. Schwartz RN, Stover L, Dutcher JP. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Williston Park)*. 2002;16(11 Suppl 13):11-20.
9. Schadendorf D, Amonkar MM, Stroyakovskiy D, Levchenko E, Gogas H, de Braud F, et al. Health-related quality of life impact in a randomised phase III study of the combination of dabrafenib and trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600 metastatic melanoma. *Eur J Cancer*. 2015;51(7):833-40.
10. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1889-94.
11. Verbeek B, Southgate TD, Gilham DE, Margison GP. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull*. 2008;85:17-33.
12. Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res*. 2007;56(4):275-87.
13. Priario JC. Historia del melanoma maligno en Uruguay. *Rev Med Uruguay*. 2005;255-68.
14. Xu-Welliver M, Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*. 2002;23(5):823-30.
15. Naumann SC, Roos WP, Jöst E, Belohlavek C, Lennerz V, Schmidt CW, et al. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer*. 2009;100(2):322-33.
16. Dolan ME, Pegg AE. O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 1997;3(6):837-47.
17. Wedge SR, Porteous JK, Newlands ES. Effect of single and multiple administration of an O6-benzylguanine/temozolomide combination: an evaluation in a human melanoma xenograft model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;40(3):266-72.
18. Hickman MJ, Samson LD. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10764-9.
19. Eich M, Roos WP, Nikolova T, Kaina B. Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(11):2529-40.
20. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68.
21. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*. 2001;15(17):2177-96.

22. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ.* 2001;8(11):1052-65.
23. Caporali S, Falcinelli S, Starace G, Russo MT, Bonmassar E, Jiricny J, et al. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol.* 2004;66(3):478-91.
24. Mirzayans R, Andrais B, Kumar P, Murray D. Significance of Wild-Type p53 Signaling in Suppressing Apoptosis in Response to Chemical Genotoxic Agents: Impact on Chemotherapy Outcome. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
25. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002;108(2):153-64.
26. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 2006;11(4):342-57.
27. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2003;22(20):3138-51.
28. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature.* 2002;419(6907):634-7.
29. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene.* 2007;26(2):186-97.
30. Roos WP, Jöst E, Belohlavek C, Nagel G, Fritz G, Kaina B. Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN- β and valproic acid. *Cancer Res.* 2011;71(12):4150-60.
31. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2002;62(6):1876-83.
32. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(20):1536-46.
33. Mhaidat NM, Zhang XD, Allen J, Avery-Kiejda KA, Scott RJ, Hersey P. Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *Br J Cancer.* 2007;97(9):1225-33.
34. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 1999;59(15):3761-7.
35. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66(2):105-43.
36. Cheng Y, Zhang G, Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(3-4):567-84.
37. Nelson D, Cox M. *Lehninger principles of Biochemistry.* Sixth ed w.h. ed: Freeman and Company; 2013.
38. Zaint AM. BRAF targets in melanoma. New York 2015.
39. Jensen CJ, Buch MB, Krag TO, Hemmings BA, Gammeltoft S, Frödin M. 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem.* 1999;274(38):27168-76.
40. Shimamura A, Ballif BA, Richards SA, Blenis J. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol.* 2000;10(3):127-35.
41. Eisenmann KM, VanBrocklin MW, Staffend NA, Kitchen SM, Koo HM. Mitogen-activated protein kinase pathway-dependent tumor-specific survival signaling in melanoma cells through inactivation of the proapoptotic protein bad. *Cancer Res.* 2003;63(23):8330-7.
42. Shah DJ, Dronca RS. Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. *Mayo Clin Proc.* 2014;89(4):504-19.
43. Aris M, Barrio MM. Combining immunotherapy with oncogene-targeted therapy: a new road for melanoma treatment. *Front Immunol.* 2015;6:46.
44. Network CGA. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015;161(7):1681-96.

45. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012;26(11):1131-55.
46. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126(1):154-60.
47. Atkinson V. Recent advances in malignant melanoma. *Intern Med J.* 2017;47(10):1114-21.
48. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005;436(7051):720-4.
49. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-7.
50. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(11):873-86.
51. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):3041-6.
52. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature.* 2010;467(7315):596-9.
53. Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6(5):751-9.
54. Haferkamp S, Borst A, Adam C, Becker TM, Motschenbacher S, Windhövel S, et al. Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2013;133(6):1601-9.
55. Acosta JC, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol.* 2012;22(4):211-9.
56. Zhu Z, Liu W, Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma--Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;99:91-9.
57. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;380(9839):358-65.
58. Dean L. Dabrafenib Therapy and BRAF and G6PD Genotype. *Medical Genetics Summaries*2017.
59. Menzies AM, Kefford RF, Long GV. Paradoxical oncogenesis: are all BRAF inhibitors equal? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(5):611-5.
60. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature.* 2006;439(7074):358-62.
61. Roskoski R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res.* 2016;103:26-48.
62. Gilmartin AG, Blears MR, Groy A, Moss KG, Minthorn EA, Kulkarni SG, et al. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):989-1000.
63. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 2012;367(18):1694-703.
64. Schick U, Kyula J, Barker H, Patel R, Zaidi S, Gregory C, et al. Trametinib radiosensitises RAS- and BRAF-mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. *Radiother Oncol.* 2015;117(2):364-75.
65. Ayala Cortes AS, Garza Rodriguez V, Ocampo Candiani J. Actualidades en el tratamiento del melanoma en etapas avanzadas. *Gazeta Médica de México*2014. p. 145-55.

66. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol.* 2011;29(22):3085-96.
67. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* 2008;68(12):4853-61.
68. Barrera Rodriguez R PZO, Madrid Marina V. Bases moleculares de la inmunología del cáncer. 1995.
69. Seliger B. Molecular mechanisms of HLA class I-mediated immune evasion of human tumors and their role in resistance to immunotherapies. *HLA.* 2016;88(5):213-20.
70. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:443-73.
71. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology : functions and disorders of the immune system. Fifth edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2016. x, 335 pages p.
72. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, et al. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6458-62.
73. Chikuma S. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017.
74. Céfaï D, Schneider H, Matangkasombut O, Kang H, Brody J, Rudd CE. CD28 receptor endocytosis is targeted by mutations that disrupt phosphatidylinositol 3-kinase binding and costimulation. *J Immunol.* 1998;160(5):2223-30.
75. Fernández-Ponce C, Hernández-Martínez JD, Silvera-Redondo C. Ctl-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. *Revista Científica Salud Uninorte.* 2006:167-81.
76. Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):250-8.
77. Boomer JS, Green JM. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(8):a002436.
78. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity.* 2016;44(5):973-88.
79. Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud, Bogotá.* 2009.
80. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest.* 2002;109(3):295-9.
81. Baroja ML, Vijayakrishnan L, Bettelli E, Darlington PJ, Chau TA, Ling V, et al. Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J Immunol.* 2002;168(10):5070-8.
82. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:29-53.
83. Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2013;94(1):25-39.
84. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543-53.
85. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med.* 2016;375(18):1767-78.
86. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007;19(7):813-24.
87. Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am.* 2000;6 Suppl 1:S11-4.
88. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.

89. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450-61.
90. Zhang S, Liang F, Li W, Wang Q. Risk of treatment-related mortality in cancer patients treated with ipilimumab: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017;83:71-9.
91. Bertrand A, Kostine M, Barnetche T, Truchetet ME, Schaeffer T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2015;13:211.
92. Raedler LA. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Health Drug Benefits*. 2015.
93. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med*. 2017.
94. Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *J Cancer*. 2017;8(3):410-6.
95. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2006-17.
96. Volpe VO, Klufas DM, Hegde U, Grant-Kels JM. The new paradigm of systemic therapies for metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(2):356-68.
97. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. 2014;384(9948):1109-17.