



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

“Estudio de los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con melanoma maligno humano como marcadores de pronóstico y progresión tumoral”

Xu Wang

Director:

Dr. Miguel Angel López-Nevot

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III

Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

Sección de Inmunología

Programa de Doctorando en Biomedicina

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Xu Wang
ISBN: 978-84-1306-890-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69079>

DEDICATORIAS

A mis padres, ZhenTao Wang y SuGe Li

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Ángel López-Nevot, director de esta Tesis tutor, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por su confianza y apoyo y por haberme transmitido su entusiasmo por la inmunología

Al Dra. Teresa Cabrera, por su esfuerzo incesante y por haberme enseñado a superar las dificultades que han surgido durante el desarrollo de este trabajo con optimismo y paciencia.

A Toñi Martín, Carmen Parejo y Alonso Fernández por ser tan buenos compañeros y encontrar siempre un momento para reír.

A todas las personas que han participado de alguna manera en la realización de esta tesis.



ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Melanoma.....	2
1.1.1. Qué es el melanoma.....	2
1.1.2. Biología del Melanoma.....	3
1.1.3. Clasificación del melanoma cutáneo.....	8
1.1.3.1. Melanoma de extensión superficial (MES).....	8
1.1.3.2. Melanoma nodular (MN).....	8
1.1.3.3. Lentigo maligno melanoma (LMM).....	9
1.1.3.4. Melanoma lentiginoso acral (MLA).....	10
1.1.4. Factores pronósticos en pacientes con melanoma cutáneo primario.....	11
1.1.4.1. Índice de espesor de Breslow.....	11
1.1.4.2. Ulceración.....	12
1.1.4.3. Índice mitótico.....	12
1.1.4.4. Edad.....	13
1.1.4.5. Sexo.....	14
1.1.4.6. Localización anatómica.....	14
1.1.5. Estadificación del melanoma.....	15
1.2. Sistema inmunológico y tumor.....	19
1.2.1. Inmunovigilancia y el desarrollo de tumores.....	19
1.2.2. Inmunoección y escape tumoral.....	21
1.2.3. Mecanismos de escape tumoral.....	25
1.2.3.1. Ausencia de coestimulación.....	25
1.2.3.2. Defecto de transducción de señal del receptor de muerte celular (Apoptosis)	
.....	26
1.2.3.3. Apoptosis de linfocitos T activados.....	26
1.2.3.4. Citocinas inmunosupresoras.....	27
1.2.3.5. Alteraciones en la expresión de las moléculas HLA de clase I.....	27
1.3. Antígenos de melanoma.....	28

1.3.1. Antígenos asociados al melanoma.....	28
1.3.1.1. Antígenos de linaje / diferenciación de melanocitos: proteínas asociadas con la síntesis de melanina.....	28
1.3.1.1.1. Tirosinasa.....	30
1.3.1.1.2. TRP-1 y TRP-2.....	31
1.3.1.1.3. Melan-A.....	32
1.3.1.1.4. gp100.....	32
1.3.1.2. Antígenos oncofetales expresados en cáncer y testículo.....	32
1.3.1.2.1. La familia MAGE.....	33
1.3.1.2.2. La familia BAGE.....	34
1.3.1.3. La familia GAGE.....	34
1.3.1.3.1. NY-ESO-1.....	35
1.3.1.3.2. SSX-2.....	35
1.3.1.4. Proteínas de la membrana celular.....	35
1.3.1.4.1. Integrinas.....	36
1.3.1.4.2. MCSP.....	36
1.3.1.4.3. Moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas.....	37
1.3.1.4.4. M Tf (Melanotransferrina).....	38
1.3.1.4.5. Proteínas S100.....	38
1.3.2. Antígenos de genes mutados- neoantígenos.....	39
1.3.2.1. Antígenos presentes de forma única en tumores individuales y rara vez compartidos por diferentes pacientes.....	39
1.3.2.2. Mutaciones clonales.....	39
1.3.2.3. Antígenos mutados sobreexpresados.....	40
1.3.3. Antígenos no proteicos asociados a tumores.....	40

1.4. Citocinas, Quimiocinas, Factores de Crecimiento y Cancer.....	41
1.4.1. Inflamación y tumor.....	41
1.4.2. Algunos ejemplos de citocinas que juegan un papel importante en el desarrollo de tumores.....	44
1.4.3. Citocinas, Quimiocina y Factores de Crecimiento en el Melanoma Maligno.....	49
1.5. Tratamiento del melanoma.....	50
1.5.1. Resección quirúrgica.....	50
1.5.2. Quimioterapia.....	50
1.5.3. Terapias dirigidas.....	51
1.5.4. Inmunoterapia.....	53
1.5.4.1. Citocinas y quimiocinas como biomarcadores para el tratamiento con inhibidores de punto de control en melanoma.....	54
1.5.4.2. Citocinas en el tratamiento del melanoma.....	58
1.5.4.3. Algunos ejemplos de citocinas en el tratamiento del melanoma.....	59
1.5.5. Vacunas.....	61
2. <i>Hipótesis</i>	68
3. <i>Objetivos</i>	70
4. <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	72
4.1. Pacientes.....	73
4.2. Muestras de suero.....	77
4.3. Cultivos de células de melanoma.....	77
4.4. Inmunoensayo multiplex.....	78
4.5. Análisis estadístico.....	79
5. <i>Resultados</i>	81
5.1. Análisis de factores solubles en cultivos de líneas de melanoma.....	82
5.2. Análisis de factores solubles en suero autólogo de pacientes con melanoma y controles sanos.....	85
5.3. Concentraciones de citocinas en pacientes con melanoma.....	88
5.4. Concentraciones de citocinas e índice de Breslow.....	92

5.5. Niveles de citocinas y BRAF.....	93
5.6. Valores predictivos de los niveles de citocinas después del análisis de supervivencia.....	94
6. <i>Discusión</i>	96
7. Conclusiones.....	103
8. Bibliografía.....	106



1. Introducción

1.1.Melanoma

1.1.1.Qué es el melanoma

El melanoma es una neoplasia maligna de melanocitos y dentro de los tumores cutáneos uno de los más agresivos, debido a su capacidad de producir metástasis [1]. Los melanocitos derivan de las células de la cresta neural y se distribuyen principalmente en la epidermis basal y en los folículos pilosos , a lo largo de las superficies mucosas, meninges y en la capa coroidea del ojo, tienen como función principal la protección de la piel[2]. Cuando el ADN se daña por los rayos UV, los queratinocitos de la piel producen la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) que se une al receptor de melanocortina 1 (MC1R) en los melanocitos para inducir la producción y liberación de melanina. El pigmento de melanina funciona como un escudo para la radiación UV, evitando así una mayor alteración del ADN [3].

En 2012, se registraron 232.000 nuevos casos de melanoma en el mundo con 55.000 muertes, ocupando el puesto número 15 entre los cánceres más frecuentes del mundo[4]. En comparación con cualquier otro tipo de cáncer, la incidencia de melanoma cutáneo en el mundo aumenta a un ritmo más rápido cada año y al mismo tiempo, también aumenta la mortalidad relacionada con el melanoma[5]. En Estados Unidos, la tasa de mortalidad aumentó en un 1.4% cada año entre 1977 y 1990. Desde 1990 la tasa de mortalidad ha mostrado una ligera tendencia a disminuir , con una disminución anual del 0,3% de 1990 a 2002[6]. La incidencia de melanoma varía mucho en diferentes países, las razones de estas diferencias pueden deberse a las diferencias en el fenotipo de la piel entre diferentes razas y las diferencias en la exposición al sol. Además, en comparación con otros tumores sólidos la mayoría de los pacientes con melanoma son jóvenes y personas de mediana edad (la edad media de diagnóstico es 57). De los 25 a los 50 años, la incidencia aumentó linealmente y luego disminuyó, especialmente entre las mujeres. Al analizar los datos de incidencia relacionados con el género, las mujeres predominan en el grupo de edad joven, mientras que los hombres son más frecuentes a partir de los 55 años [7].

1.1.2. Biología del Melanoma

La diseminación del melanoma se produce por alteraciones del microambiente tumoral mediada por la sobreexpresión de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), especialmente MMP- 9 y MMP-2, que pueden inducir la degradación de los componentes de la matriz extracelular y facilitar la infiltración de las células tumorales y su diseminación por el torrente sanguíneo[1, 8, 9]. La desregulación de la vía del factor nuclear NF-κB condiciona la sobreexpresión de estas proteínas. El factor nuclear-κ B puede inducir la sobreexpresión de la metaloproteína -9 de la matriz al activar la osteopontina (OPN), una proteína del microambiente tumoral. [10-12].

Además de las alteraciones del microambiente tumoral, las mutaciones somáticas en oncogenes o genes supresores de tumor facilitan la aparición y el desarrollo del melanoma como ocurre en la mayoría de los tumores humanos[13].La exposición prolongada o intermitente al sol puede causar mutaciones somáticas que afectan a genes que controlan procesos celulares claves como:

a) la proliferación celular : *BRAF*, *NRAS* , *NFI* y el receptor tirosina quinasa del protooncogén kit (kit).

b) La reparación del DNA y la resistencia a la apoptosis [proteína tumoral p53 (*TP53*)]

c) crecimiento y metabolismo [fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*) d) control del ciclo celular [inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*)] y e) esperanza de vida replicativa [transcriptasa inversa de telomerasa (*TERT*)][14, 15]. Las alteraciones genómicas generalmente conducen a la activación anormal de dos vías de señalización principales en el melanoma: cascada de señalización RAS / RAF / MEK / ERK [también conocida como vía de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)] y fosfoinositida-3-quinasa (PI3K) / Vía AKT[16].

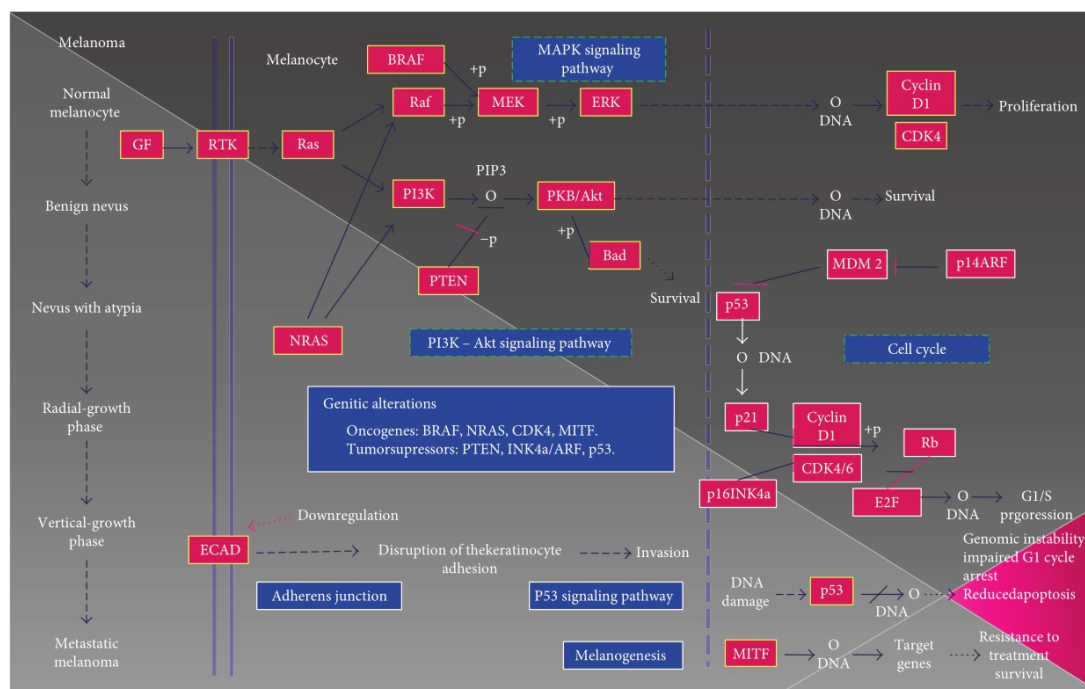


Figura 1. Esquema de la multitud de factores genéticos interconectados que influyen en la patogenia del melanoma. Las mutaciones oncogénicas de NRAS activan las vías efectoras PI3K-AKT y Raf-MEK-ERK, esta última vía también se activa mediante mutaciones en el gen BRAF, mientras que la activación de la vía PI3K-AKT está condicionada por la pérdida o mutación del gen supresor de tumores PTEN. Estos cambios generalmente se conservan a lo largo de la progresión del tumor. Se ha demostrado que el desarrollo de melanoma está fuertemente asociado con la inactivación de los supresores tumorales p16INK4a / proteína quinasa dependiente de ciclina 4 y 6 (p16INK4a / CDK4,6) y p14ARF. Otros factores como el de transcripción asociado a microftalmia (MITF) y p53 juegan un papel crucial en la progresión del melanoma (Rodríguez-Cerdeira et al. Mediators Inflamm 2017;2017: 3264217).

La vía de MAPK es una de las vías importantes para transducir señales extracelulares al núcleo, como hormonas y factores de crecimiento, que conducen a la expresión de genes impulsores centrales de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular[17]. Algunos estudios han señalado que la activación de la vía MAPK es un papel clave en la biología de diferentes tipos de cáncer, y es la vía de activación anormal más común en el melanoma[18]. La vía PI3K implica la homeostasis celular, y su activación es otro factor clave en diferentes tipos de cáncer. Es la segunda vía de activación anormal más frecuente del melanoma[19, 20].

Hasta en un 90% de los pacientes con melanoma se ha detectado una activación anormal de la vía MAPK, que se considera el paso central de la aparición, formación y desarrollo del melanoma, y conduce a una desregulación del ciclo celular e inhibe la apoptosis[17, 20, 21]. Entre los diversos mecanismos que conducen a señales anormales de la vía MAPK en pacientes con melanoma, la anomalía genética más común es la mutación de *BRAF*[22]. Del 37% al 50% de los

pacientes con melanoma presentan mutaciones somáticas del gen *BRAF*, y la incidencia de mutaciones *BRAF* en pacientes con melanoma causadas por el daño intermitente por exposición al sol ha alcanzado el 60%[23]. Generalmente, La mayoría de las mutaciones de *BRAF* en pacientes con melanoma se deben a la sustitución de la valina en la posición 600 por otros aminoácidos. Aproximadamente el 80-90% de las mutaciones *BRAF* son V600E (valina por ácido glutámico), mientras que el 5-12% consiste en la sustitución de valina por lisina (V600K) y $\leq 5\%$ son V600D (valina por ácido aspártico) o V600R (valina por arginina)[24, 25].

Las mutación activadora de *NRAS* es la segunda causa más común de anomalía en la señal de la vía MAPK en el melanoma, y representa entre el 15% y el 30% de todos los casos de melanoma. Son mutaciones sin sentido en el codón 12, 13 o 61, y la mutación sin sentido del codón 61 es el caso más común, que representa aproximadamente el 80% de todas las mutaciones *NRAS* en el melanoma[23, 26]. Las mutaciones de estos codones inactivan la actividad GTPasa de *NRAS* y por tanto prolongan la unión a GTP que mantiene la actividad de *NRAS* estimulando las vías MAPK y PI3K. Cabe señalar que los estudios han demostrado que las mutaciones *NRAS* y *BRAF* son mutuamente excluyentes, por lo que rara vez se producen co-mutaciones [27]

NF1 es un gen supresor de tumor y ocupa el tercer lugar de los genes mutados en melanoma con una frecuencia alrededor del 10% al 15% [28]. La proteína NF1 regula a la familia RAS al convertir el RAS-guanosina trifosfato activo (RAS-GTP) en el ras-guanosina difosfato inactivo (ras-GDP), inhibiendo la señalización ras corriente abajo [29]. Por lo tanto, la pérdida de la función de NF1 conduce a una sobreactivación de la proteína *NRAS*, aumentando así las vías de señalización de MAPK y PI3K[28]. La exposición prolongada al sol es un factor de riesgo de mutación de *NF1*. Cabe señalar que la mutación del gen *NF1* puede ocurrir simultáneamente con la mutación *BRAF* o *NRAS*[30, 31].

El receptor de tirosina quinasa KIT participa en la proliferación y supervivencia del melanoma a través de la vía PI3K / AKT y RAS / RAF / MEK / ERK . Representa el 2-8% de todos los casos de mutación de activación somática de pacientes con melanoma. Esta mutación es más frecuente en pacientes de melanoma con exposición solar intermitente[32, 33].

Las mutaciones somáticas de los genes *BRAF*, *NRAS*, *NFI* y *KIT* juegan un papel importante en el desarrollo del melanoma. Sin embargo, existen algunos genes mutados relacionados con la invasión y metástasis del melanoma. Por ejemplo, la mutación del promotor de *TERT* aumenta la capacidad de proliferación de las células de melanoma junto con las alteraciones de *CDKN2A* heterocigotas, que a menudo se detectan en el melanoma in situ[34]. El gen *CDKN2A* codifica p16^{INK4A}, que es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina. La inactivación bialélica adicional de *CDKN2A* es un paso posterior al melanoma invasivo[34, 35]. *PTEN* es un gen supresor de tumor que participa en el control de la progresión del ciclo celular. La incidencia de mutaciones de *PTEN* en melanoma es del 10-30%, y suelen detectarse en la fase de crecimiento vertical y en las metástasis[36]. Cabe señalar que las mutaciones de *PTEN* suelen ser mutuamente excluyentes con las mutaciones de *NRAS*, pero a menudo ocurren junto con la ganancia de funcionalidad de B-raf. La pérdida de función de *PTEN* está relacionada con el aumento de la activación de la vía PI3K / AKT [37, 38]. De hecho, las mutaciones de *BRAF* y la pérdida de función de *PTEN* juntas activan la vía MAPK y la vía PI3K, por lo que son potencialmente equivalentes a la activación exclusiva de N-ras. En el ámbito clínico, la pérdida de función de *PTEN* representa uno de los mecanismos de resistencia adquirida a fármacos del melanoma mutante B-raf tratado con inhibidor de B-raf [39].

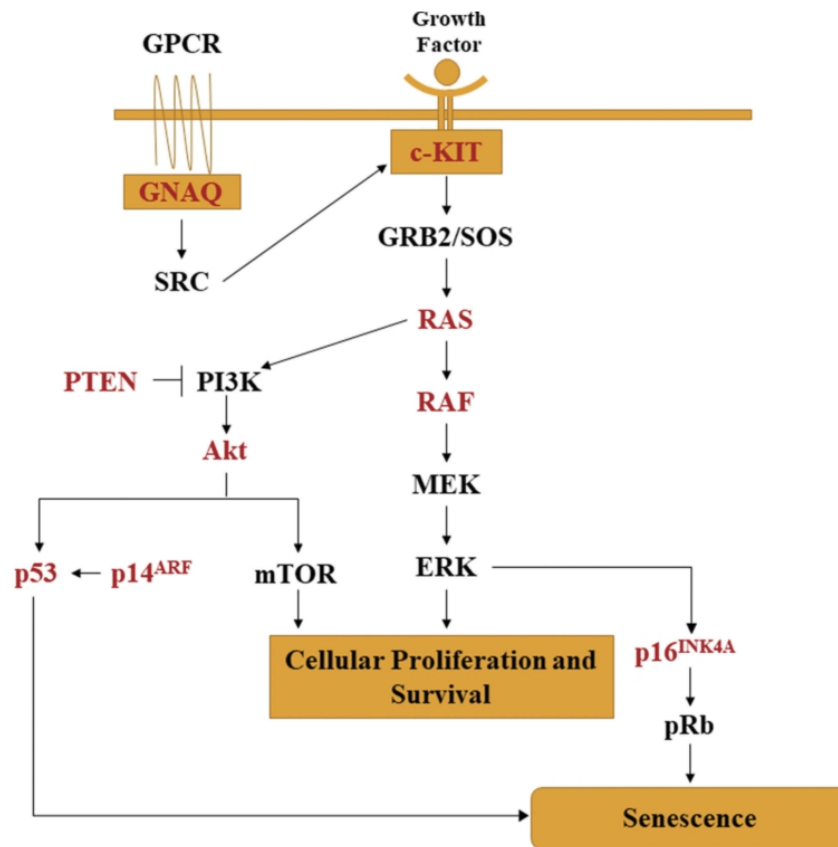


Figura 2. Vías oncogénicas comúnmente desreguladas en el melanoma. Las mutaciones en NRAS, BRAF, GNAQ y c-KIT conducen a una señalización constitutiva de MAPK que conduce a una proliferación y supervivencia desenfadadas. La cascada de fosfatidilinositol 3' quinasa (PI3K) es activada por NRAS oncogénico. Las mutaciones del gen CDKN2A provocan la pérdida de P16INK4A o P14ARF o ambos, dependiendo de dónde ocurran las mutaciones. Las mutaciones CDKN2A son frecuentes en el melanoma hereditario. (Lauren E et .,al CANCER BIOLOGY & THERAPY 2019, VOL. 20, NO. 11, 1366 - 1379)

1.1.3. Clasificación del melanoma cutáneo.

Según las características histológicas y clínicas, el melanoma se puede dividir en 4 subgrupos principales: melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, lentigo maligno melanoma y Melanoma lentiginoso acral

1.1.3.1. Melanoma de extensión superficial (MES)

El melanoma de extensión superficial (MES) es el tipo más común de melanoma, representa alrededor del 70% de todos los casos, y es más común en la parte posterior del tórax en los hombres y en la parte posterior de las piernas de las mujeres. La exposición intermitente al sol es un factor de riesgo importante. Durante el examen clínico, el contorno y el borde de la lesión son regulares, pudiendo haber varias protuberancias irregulares o nódulos palpables, que pueden invadir la piel varios milímetros. Este tipo de melanoma puede presentar diferentes tonalidades de varios colores como marrón, negro, gris y pueden presentar zonas depigmentadas [40].

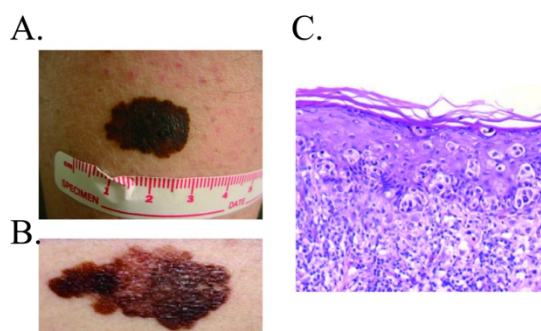


Figura 3. Melanoma de extensión superficial.

A y B Imagen macroscópica del MES. C Imagen histológica de MES

1.1.3.2. Melanoma nodular (MN)

El melanoma nodular representa aproximadamente el 5% de todos los casos de melanoma. Este tipo de melanoma es más común en pacientes masculinos., aparece con más frecuencia en el tronco y extremidades en personas de 50 a 60 años. Este tipo de melanoma tiene las características de invasión de la piel, que solo tiene un período de crecimiento vertical pero no un período de crecimiento radial, y generalmente está ulcerado, lo que conduce a una tasa de crecimiento más rápida y una mayor tasa de metástasis [40]. En el examen clínico, puede ser un nódulo de

superficie lisa, una protuberancia de contorno irregular o un pólipo ulceroso y su color puede ser marrón, negro y azul-negro, aproximadamente la mitad de los MN son acrómicos. La exposición intermitente es un factor de riesgo de melanoma nodular[41].

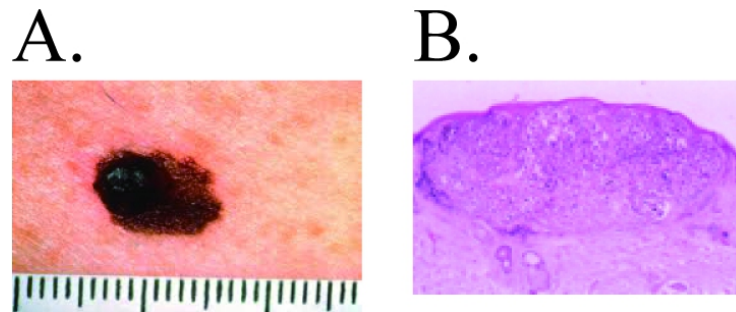


Figura 4. Melanoma nodular

A. Imagen macroscópica de MN. B. Imagen histológica de MN

1.1.3.3. Lentigo maligno melanoma (LMM)

Melanoma lentigo maligno representa alrededor del 4% al 15% de todos los casos de melanoma, que a menudo ocurre en la cabeza y el cuello y se caracteriza por la proliferación de células ubicadas en la capa basal de la epidermis. La exposición prolongada al sol y el envejecimiento son sus factores de riesgo. El lentigo maligno melanoma puede tener diferentes colores, como el negro y el marrón. Pueden pasar décadas desde su aparición inicial hasta su invasión a la dermis papilar[40]. En el examen clínico, el LMM suele tener un contorno irregular y el tumor es relativamente plano y grande, en raras ocasiones se puede detectar un foco de invasión nodular [41].

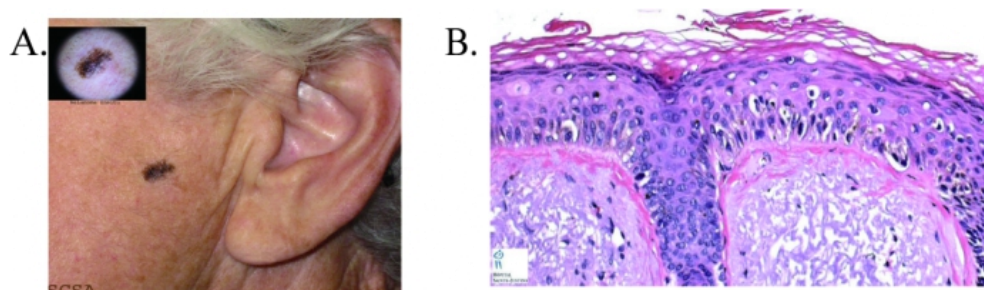


Figura 5. Imágenes Macroscópica (A) e Histológica (B) del Lentigo Maligno Melanoma (LMM)

1.1.3.4. Melanoma lentiginoso acral (MLA)

El Melanoma lentiginoso acral es el tipo más frecuente de melanoma entre los pacientes hispanos, asiáticos y africanos pero es menos común en otras áreas, representando solo 5% de todos los casos de melanoma . Los pacientes son principalmente mujeres y se presenta principalmente por encima de la sexta década. Los sitios de aparición más frecuentes son los dedos de las manos y las plantas de los pies y generalmente involucran el lecho ungueal de los pulgares o de los dedos de los pies[40].

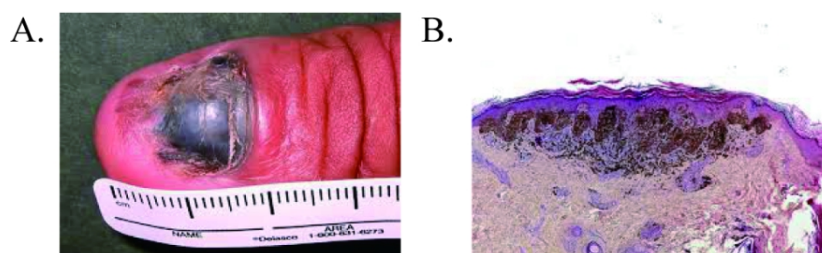


Figura 6. Imagen macroscópica (A) e histológica (B) de Melanoma Lentiginoso Acral (MLA)

Tabla 1. subtipo clínico de melanoma

subtipo clínico de melanoma	%	exposición al sol	localización	Aspectos clínicos	colores
Melanoma de extensión superficial	70	Intermitente	espalda-hombre piernas-mujer	Plano pápula nódulo	Bronceado, Marrón, Gris Negro, Violeta, rosa
Melanoma nodular	5	Intermitente	tronco extremidad	Nódulo Pólipo ulcerado Placa elevada	Marrón, Negro, Acrómico
Lentigo maligna melanoma	4-15	A largo plazo	Cabeza, Cuello	plano	Marrón, Negro
Melanoma lentiginoso acral	5	N/A	Piel glabra	Plano, pápula	Irregular

1.1.4. Factores pronósticos en pacientes con melanoma cutáneo primario

1.1.4.1. Índice de espesor de Breslow

El concepto de grosor tumoral fue propuesto por primera vez por Breslow en 1970, que se refería a medir la distancia desde la parte superior de la capa granular hasta las células de melanoma más profundas con un micrómetro. Desde que se presentó el concepto, se convirtió en el factor de pronóstico más potente del melanoma invasivo primario. Posteriormente se desarrolló un esquema de clasificación clínicamente útil. Los pacientes con un grosor tumoral menor de 0.76 mm fueron designados como pacientes de bajo riesgo, porque el melanoma delgado rara vez metastatizaba y la tasa de supervivencia a 5 años era del 97,9%. Los pacientes de riesgo bajo y medio presentaban un grosor del melanoma entre 0.76 y 1.5 mm y la supervivencia a 5 años fue del 91,7%. Los pacientes de riesgo medio tenían un grosor tumoral superior a 1.5 mm pero inferior a 4.0 mm, con una supervivencia a 5 años del 72,8%. Los pacientes con un grosor tumoral superior a 4.0 mm tenían riesgo de recurrencia, con una tasa de supervivencia a 5 años del 57,5%[42]. En el sistema de estadificación AJCC posterior, se seleccionaron 1.0 mm, 2.0 mm y 4.0 mm como puntos de corte para un uso más conveniente[43]. El melanoma con un grosor menor o igual a 1 mm se define como melanoma delgado, y este grado de melanoma suele tener un buen pronóstico. Los tumores con un grosor de más de 4.0 mm se definen como melanoma grueso y generalmente tienen un pronóstico desfavorable. Un gran número de estudios ha demostrado que existe una alta correlación entre el grosor del melanoma y la tasa de supervivencia a 10 años de los pacientes con melanoma. La tasa de supervivencia a 10 años de 11.841 pacientes con melanoma delgado (1.0 mm o menos) fue del 92%. , del 80% en 8046 pacientes con melanoma con 1.01-2.0 mm , la de 5291 pacientes con tumor con 2.01-4.0 mm fue del 63% , y del 50% en los 2,461 pacientes con melanoma grueso (más grueso de 4.0 mm). El espesor del tumor es el factor pronóstico más importante para la supervivencia de los tumores primarios algo que está ampliamente aceptado [44-46].

1.1.4.2. Ulceración

La ulceración se define como la pérdida de la continuidad del epitelio. Una gran cantidad de estudios ha demostrado que los pacientes con melanoma primario ulcerado tienen peor pronóstico[44, 47]. La tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con melanoma ulcerado es del 66,2%, mientras que la de los pacientes sin ulceración es del 91,6%[42]. Por lo tanto, la existencia de ulceración en el melanoma primario es el segundo predictor más poderoso de supervivencia en el sistema de estadificación AJCC de 2002 y el tercer predictor más poderoso de supervivencia en el sistema de estadificación AJCC de 2010[44, 45]. Los tumores más gruesos son más propensos a ulcerarse. La incidencia de ulceración en el melanoma de espesor delgado (1.0 mm o menos) fue del 6%, mientras que en el melanoma grueso (más grueso de 4.0 mm) se elevó al 63%. Aunque la incidencia de ulceración está relacionada con el grosor del melanoma, la ulceración es un factor predictor del pronóstico del melanoma independiente del grosor del tumor. Se estima que el riesgo de los pacientes con melanoma con ulceración es el doble que el de los pacientes sin ulceración. La tasa de supervivencia de los pacientes con ulceración es la misma que la de los pacientes con melanoma sin ulceración del siguiente nivel en el sistema de estadificación AJCC. Por ejemplo, la tasa de supervivencia a 5 años del melanoma con ulceración de 1.01-2.0 mm de espesor es del 82% y la del melanoma sin ulceración de 2.01-4.0 mm de espesor es del 79%, por lo que ambos se clasifican como estadio IIA[44-46].

1.1.4.3. Índice mitótico

La tasa mitótica es una medida de la proliferación del melanoma primario. Cuando el melanoma se analiza en la fase de crecimiento vertical, es uno de los factores de predicción de supervivencia más potentes. Se puede evaluar fácilmente de forma cuantitativa en el examen histopatológico[48]. El acuerdo actual es informar la tasa mitótica de la dermis en tumores en fase de crecimiento vertical como número mitótico / mm². Primero se debe encontrar el área del tumor o "punto caliente" con la mayor actividad mitótica. Luego se cuentan las mitosis sobre un área de al menos 1 mm². Si las mitosis en la región son escasas y no se pueden encontrar "puntos calientes", entonces se evalúa el área de 1 mm alrededor de una mitosis representativa y el resultado se expresa como el número de mitosis / mm²[49]. Muchos estudios han señalado que en

pacientes con melanoma de espesor delgado, la tasa mitótica es altamente predictiva de supervivencia y el tiempo de supervivencia se correlaciona negativamente con la tasa mitótica. La tasa mitótica más rápida, el tiempo de supervivencia más corto. En un estudio poblacional, la tasa de supervivencia a 5 años de pacientes con índice mitótico de 0 mitosis / mm² fue del 98.7%, del 85,1% para los pacientes con 0.1-6.0 mitosis / mm, 68.2% para los pacientes con un número superior a 6 mitosis / mm. Los estudios han demostrado que la tasa mitótica y el grosor del tumor son dos factores independientes para predecir la supervivencia [42]. En el análisis multivariante de 4.861 pacientes con melanoma del espesor delgado, el índice de espesor de Breslow, la tasa mitótica y la ulceración son los factores más poderosos que predicen la supervivencia. En el mismo estudio, cuando se incluyeron la tasa mitótica y la ulceración en el cálculo de la tasa de riesgo, el nivel de invasión de Clark perdió su significación estadística [45, 46]

1.1.4.4. Edad

Un gran número de estudios ha demostrado que los pacientes de edad avanzada con melanoma suelen tener un peor pronóstico y los pacientes con melanoma mayores de 60 años son un grupo de alto riesgo. En el análisis de 17.600 pacientes, se encontró que la tasa de supervivencia de los pacientes con melanoma continuó disminuyendo con el aumento de la edad. Cabe señalar que aunque los pacientes de edad avanzada suelen presentar melanoma de espesor grueso y ulcerado, lo que es desfavorable para el pronóstico, los estudios han demostrado que la edad del paciente es un factor independiente para predecir la evolución del melanoma [44, 45, 50]. La explicación dada por los investigadores es:

a) Con el aumento de la edad de los pacientes, la función inmunológica disminuye gradualmente y la capacidad del cuerpo para combatir y eliminar las células malignas disminuye, lo que resulta en una mayor incidencia y mortalidad del cáncer [51].

b) En comparación con los pacientes más jóvenes, es posible que el deterioro del estado de salud de los pacientes ancianos no permite que puedan recibir un tratamiento adecuado [52].

1.1.4.5.Sexo

El sexo es un factor importante para predecir el pronóstico de los pacientes con melanoma. Existen diferencias significativas entre mujeres y hombres en cuanto a la incidencia del melanoma, las características del tumor primario y la supervivencia[51, 53, 54]. Los patrones sexuales en la incidencia son diferentes en diferentes regiones, la incidencia de melanoma en las mujeres es más alta que en los hombres en Europa, mientras que en Australia y Estados Unidos, la incidencia de melanoma en hombres es mayor. Aunque la incidencia de melanoma es diferente en diferentes regiones y diferentes sexos, la supervivencia de las pacientes femeninas con melanoma es consistentemente mayor que la de los pacientes masculinos, porque las mujeres suelen tener melanoma primario con buen pronóstico, es decir, tumores delgados y no úlcerados localizados en las extremidades, que se puede detectar fácilmente y la edad de presentación de la enfermedad es inferior que la de los hombres[53-55]. En un estudio de 7.338 pacientes con melanoma cutáneo primario en el sur de Alemania, la supervivencia del melanoma a 10 años de los hombres (83,9%) fue menor que la de las mujeres (89,5%) [56]. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la ventaja femenina en la supervivencia específica del melanoma desapareció a partir de los 60 años. Otros estudios han demostrado que la tasa de supervivencia de las mujeres en todos los grupos de edad es más alta que la de los hombres [57, 58]. Los factores hormonales, las diferencias en la inmunidad, en el estrés oxidativo pueden ser algunas de las razones de las diferencias en las tasas de supervivencia entre hombres y mujeres para el melanoma maligno [59, 60].

1.1.4.6.Localización anatómica

La localización del melanoma es un predictor independiente de pronóstico [44, 45]. El melanoma en las extremidades a menudo tiene un buen pronóstico, mientras que el melanoma en el tronco, la cabeza y el cuello a menudo tiene un pronóstico precario, estos tumores se denominan melanomas axiales, que a menudo causan metástasis en lugares distantes, mientras que el melanoma de las extremidades genera metástasis en los ganglios linfoides adyacentes[61, 62]. La diferencia en el pronóstico del melanoma, en relación a su localización puede explicarse por el drenaje linfático . Los vasos linfáticos de las extremidades son más largos que los del melanoma

axial, y las células cancerosas metastásicas atraviesan más ganglios linfáticos en la circulación linfática, lo que puede ser una razón importante para un mejor pronóstico del melanoma de las extremidades[61].

1.1.5. Estadificación del melanoma

La estadificación correcta del melanoma se basa en la evaluación clínica y la confirmación histológica. Hoy en día, el sistema TNM del American Cancer Joint Committee se utiliza ampliamente para estadificar el melanoma clínica y patológicamente (Tabla 2 y Tabla 3) [63].

La categoría T (Tumor) se refiere al tumor primario, significa que la lesión se confirma como melanoma mediante examen histológico y se clasifica según el grosor total del tumor, la existencia de ulceración y la presencia de mitosis en la lesión menor de 1 mm de grosor [64, 65].

La categoría N (“Node” ganglio) está determinada por el número de ganglios linfáticos afectados. El estado de los ganglios linfáticos debe evaluarse preliminarmente cuando se realiza un examen clínico antes de la operación. Si no hay ninguna manifestación de compromiso de los ganglios linfáticos en el examen físico preliminar antes de la operación, la biopsia del ganglio centinela se debe realizar en el momento de la intervención para todos los melanomas con un grosor superior a 1 mm. En el caso de adenopatías palpables detectadas durante el examen preliminar, se debe utilizar una extracción con aguja fina guiada por ecografía para confirmar el estado de los ganglios linfáticos. Las guías actuales no recomiendan la biopsia del ganglio centinela para melanoma con grosor inferior a 0,75 mm, pero cuando existen algunas características de alto riesgo, como invasión de vasos linfáticos, ulceración y recuento mitótico elevado, también se debe considerar la biopsia del ganglio centinela para lesiones con grosor inferior a 0,76-1 mm [66].

La categoría M (Metástasis) se refiere a la existencia de metástasis a distancia fuera del área locoregional linfática. Si existen metástasis, se clasifica según la ubicación de la metástasis (piel, ganglios linfáticos, vísceras, pulmón o lactato deshidrogenasa sérica elevada). Los melanomas primarios sin metástasis ganglionares o a distancia, se pueden clasificar en los estadios I o II según la profundidad de la invasión vertical, el estadio III se refiere a pacientes con metástasis ganglionares y el estadio IV se refiere a pacientes con metástasis a distancia [67, 68].

Tabla 2 clasificación TNM del melanoma

clasificación T	Índice de Breslow (mm)	estado de ulceración	tasa mitótica
T1a	≤1.0	No	menos que 1/mm ²
T1b		Si	1 o más/mm ²
T2a	1.01-2.0	No	cualquier
T2b		Si	cualquier
T3a	2.01-4.	No	cualquier
T3b		Si	cualquier
T4a	>4.0	No	cualquier
T4b		Si	cualquier
clasificación N	No. de ganglios con metástasis	presentación	metástasis en tránsito o satélite
N1a	1	clínicamente indetectable(en biopsia del ganglio centinela)	No
N1b	1	clínicamente detectable	No
N2a	2-3	clínicamente indetectable(en biopsia del ganglio centinela)	No
N2b	2-3	clínicamente detectable	No
N2c	0	clínicamente oculto o detectado	Si
N3a	≥4 clínicamente ocultas (en biopsia del ganglio centinela)	-	-
N3b	1 o más clínicamente detectable	clínicamente detectable	Si

Tabla 2: continuación

clasificación M	sitio metastásico	nivel de LDH en suero
M1a	piel subcutánea o node distantes	Normal
M1b	pulmón	Normal
M1c	todos los demás viscerales	Normal
M1c	Cualquier	elevado

(Ward et al. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. 2017)

Tabla 3. Estadios patológicos para el melanoma cutáneo

	Estadificación clínica				Estadificación patológica			5 años de supervivencia (%)	10 años de supervivencia (%)
	T	N	M		T	N	M		
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0	>99	>99
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0	95	88
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0	91	83
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0	89	79
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0	77	64
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0	79	64
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0	63	51
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0	67	54
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0	45	32

Tabla 3: Continuación

	Estadificación clínica				Estadificación patológica			5 años de supervivencia (%)	10 años de supervivencia (%)
	T	N	M		T	N	M		
III	Cualquier T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0	70	63
					T1-4a	N2a	M0	64	57
				IIIB	T1-4b	N1a	M0	53	38
					T1-4b	N2a	M0	50	36
					T1-4a	N1b	M0	59	48
					T1-4a	N2b	M0	46	39
					T1-4a	N2c	M0	N/A	N/A
					T1-4b	N1b	M0	29	24
				IIIC	T1-4b	N2b	M0	24	15
					T1-4b	N2c	M0	27	18
				Any T	N3	M0	19	16	
IV	Cualquier T	cualquier N	cualquier M	IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a	7	3

La estadificación clínica incluye la microestadificación del melanoma primario y la evaluación clínica / radiológica de metástasis. Por convención, se debe utilizar después de la escisión completa del melanoma primario con evaluación clínica de metástasis regionales y distantes.

La estadificación patológica incluye la microestadificación del melanoma primario e información patológica sobre los ganglios linfáticos regionales después de una linfadenectomía parcial (es decir, biopsia del ganglio centinela) o completa (extripación de los ganglios locoregionales) (Balch et al, J Clin Oncol 2009;27: 6199-206)

1.2. Sistema inmunológico y tumor

1.2.1. Inmunovigilancia y el desarrollo de tumores

Paul Erlich propuso el concepto de vigilancia inmunitaria en 1909 para demostrar que el sistema inmunológico del huésped puede evitar que las células neoplásicas se conviertan en tumores.[69, 70]. 50 años después con el desarrollo de los estudios sobre el trasplante de tejidos, Medawar trasplantó células tumorales de diferentes cepas de ratones a un ratón inmunocompetente y se produjo el rechazo del tumor. El sistema inmunológico del ratón trasplantado reconoció y destruyó las células tumorales trasplantadas. Curiosamente, el rechazo al trasplante no se produjo cuando se trasplantaron células tumorales a la misma cepa de ratones. Por lo tanto, el rechazo del trasplante en el experimento de Medawar estaba dirigido a las células de diferentes cepas de ratones que expresaban diferentes antígenos de histocompatibilidad y no de forma específica frente a las células tumorales. Al mismo tiempo, se descubrió en cepas de ratones endogámicas donde todos los individuos tienen el mismo MHC que el sistema inmunológico tiene capacidad para desarrollar una respuesta inmunitaria específica frente a las células tumorales inducidas por carcinógenos químicos o virus. Esto demostró que el sistema inmunológico realmente puede identificar y destruir las células tumorales de forma específica.[71, 72].

Burnet y Thomas predijeron que los linfocitos actúan como centinelas en el proceso de inmunovigilancia y pueden identificar y eliminar células transformadas [73-76]. Para probar esta hipótesis, se planteó que los ratones con sistemas inmunes dañados tenían una mayor incidencia de cáncer que los ratones normales bajo la estimulación de carcinógenos químicos. Los investigadores intentaron usar ratones atómicos nude para verificar esta hipótesis, pero específicamente, en la cepa de ratones nude CBA/H, la incidencia de tumor espontáneo o tumor causado por la estimulación por MCA (meticolantreno) no mostró un aumento obvio, ni presentaba acortamiento del tiempo de latencia tumoral al comparar con la cepa salvaje [77, 78]. Varios estudios han demostrado que los ratones inmunosuprimidos y los ratones desnudos no muestran una mayor incidencia de cáncer que los ratones normales[79, 80]. Se comenzó a dudar del papel del sistema inmunológico en el desarrollo tumoral, por lo que la hipótesis de la inmunovigilancia se abandonó gradualmente.

Las posibles razones para no encontrar la relación esperada entre el sistema inmunológico y la tumorigénesis son las siguientes. Primero, ni los ratones inmunosuprimidos ni los ratones desnudos (nude) atímicos nudes eran modelos perfectos para los experimentos de inmunodeficiencia, ya que podían producir células NK y una pequeña cantidad de células T α β funcionales y por tanto mostrar algún grado de inmunidad adaptativa [81, 82]. En segundo lugar, en ese momento no se conocía mucho sobre las células NK y su papel en la inmunidad innata ni el proceso antitumoral [83]. En tercer lugar, no se tenía un conocimiento profundo sobre la relación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en la respuesta antitumoral [84].

En los años 90, dos hallazgos clave despertaron de nuevo el interés por la inmunovigilancia frente al cáncer. El primer hallazgo estaba relacionado con el papel del INF gamma para inhibir el crecimiento de tumores trasplantados y la formación de tumores espontáneos o inducidos por carcinógenos químicos [85]. Cuando las células tumorales se trasplantaron a ratones que habían recibido previamente anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos para el INF- γ los fibrosarcomas inmunogénicos crecieron más rápido en los ratones tratados que en los ratones control [86]. Además, también se encontró que la incidencia de cáncer inducido por metil colantreno (MCA) en los ratones de la cepa 129 / SvEv que carecían del receptor de IFN- γ era de 10 a 20 veces mayor que en los ratones de la cepa salvaje [87].

El segundo hallazgo clave fue que en comparación con los ratones salvajes, los ratones con pérdida del gen de la perforina (C57BL/6) tienen más probabilidades de desarrollar tumores bajo la estimulación de MCA [88]. Otros estudios indicaron que, los ratones con pérdida del este gen tenían una alta incidencia de linfomas espontáneos aunque no inducidos por MCA [89]. La perforina es un componente importante de los gránulos citotóxicos de las células NK y de los linfocitos T CD8 citotóxicos y desempeña un papel importante en el proceso de lisis dependiente de los linfocitos [90].

Los dos hallazgos anteriores muestran que el sistema inmunológico juega un papel muy importante en el proceso de desarrollo tumoral, por lo que los investigadores comenzaron a estudiar nuevamente la relación entre el sistema inmunológico y el tumor. Muchos resultados anteriores se obtuvieron en el estudio de ratones. Posteriormente, cada vez más investigaciones obtuvieron resultados sobre la inmunovigilancia en humanos. Por ejemplo:

a) En comparación con poblaciones inmunocompetentes, los pacientes que han sido trasplantados y tratados con inmunosupresores tienen una mayor incidencia de cáncer de origen no viral[91].

b) Las personas trasplantadas presentaron una alta tasa de incidencia de cáncer de origen viral, por ejemplo: sarcoma de Kaposi (herpesvirus 8) , linfoma no-Hdogkin (virus de Epstein-Barr)[92].

c) La presencia de linfocitos infiltrantes en los tumores se ha convertido en un predictor positivo de supervivencia muy útil [93].

Estos estudios han demostrado que el sistema inmunológico juega un papel muy importante en la respuesta del individuo frente al cáncer.

1.2.2. Inmunoedición y escape tumoral

El concepto de inmunovigilancia ha sido reconocido gradualmente y se ha confirmado que el sistema inmunológico podía distinguir y destruir células que sufren un proceso de desdiferenciación. Entonces surgía la pregunta, ¿Cómo se forma y se desarrolla el tumor en personas inmunocompetentes? Una posible explicación era que durante el proceso de formación del tumor, las células con alta inmunogenicidad fueron reconocidas y destruidas por el sistema inmunológico, mientras que las que son poco inmunógenicas tenían una mayor capacidad de sobrevivir y escapar a la acción del Sistema Inmunitario del huésped. De tal forma, tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa participan en el proceso de edición de la inmunogenicidad final de las células tumorales. Se propuso el término inmunoedición para describir que el sistema inmunológico puede modelar el fenotipo de los tumores [76, 94].

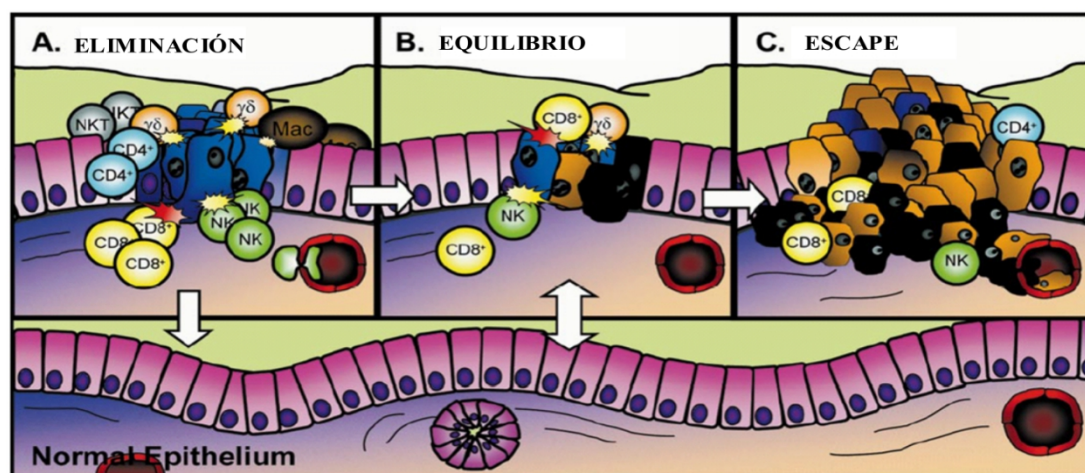


Figura 7. Las tres E de la inmunoección del cáncer por el Sistema Inmunológico (a) eliminación, (b) equilibrio, (c) escape. En las fases de eliminación y equilibrio, el sistema inmune puede eliminar las células transformadas, pero en la etapa de escape se acumula una gran cantidad de variantes de células tumorales lo que excede la capacidad de eliminación del sistema inmunológico. (Dunn et al. Annu.Rev.Immunol. 2004, 22: 329-60).

Este proceso está compuesto de tres fases: eliminación, equilibrio y escape:

- a) La fase de eliminación se relaciona con el concepto de inmunovigilancia. Esta fase se inicia cuando el tumor adquiere un cierto tamaño, formando nuevos vasos sanguíneos y comienza a invadir los tejidos normales [84, 95]. Las células tumorales secretan moléculas proinflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas para reclutar varias células de la respuesta innata como NK, células dendríticas, macrófagos junto con linfocitos T $\gamma\delta$ y NKT cuya función se sitúa entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Estos linfocitos infiltrantes reconocen moléculas antigénicas que se expresan en la superficie de las células tumorales durante el proceso de transformación.[96-99].

En un segundo paso, la función de reconocimiento de la inmunidad innata se refuerza aún más. El IFN- γ producido por la estimulación de células tumorales puede inducir en las células estromales la producción de quimiocinas como CXCL9 (la quimiocina inducida por IFN- γ , MIG) y CXCL10 (la proteína 10 inducible por IFN- γ , IP10) [100, 101]. Algunas de estas quimiocinas pueden inhibir la neovascularización dentro del tumor por su acción angiostática. Los macrófagos infiltrantes del tumor pueden producir IL-12 por la estimulación de IFN- γ y la IL-12 pueden estimular a las células NK para que produzcan más IFN- γ y de esta forma se genera un circuito de retroalimentación positiva. [102, 103]. La pequeña cantidad inicial de IFN- γ estimula al sistema inmunológico y finalmente genera una gran cantidad de IFN- γ que puede inducir la lisis

de una elevada proporción de células tumorales por los mecanismos angiostáticos, proapoptóticos y antiproliferativos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) situadas en la superficie de los macrófagos activados pueden ayudar a las células NK a eliminar células tumorales [104-107].

En un tercer paso la inmunidad innata estimula al sistema inmunológico para producir una respuesta específica frente a los antígenos tumorales. Las células dendríticas inmaduras se reclutan en el sitio del tumor y luego interactúan con las células NK en el sitio o se activan bajo la estimulación de citocinas.[108]. Estas células dendríticas activadas captan los antígenos tumorales y luego las células dendríticas maduras migran a los ganglios linfáticos para estimular la activación de células CD4 + Th1 vírgenes. Al mismo tiempo, estas células dendríticas pueden inducir el desarrollo de células T CD8 + mediante la presentación cruzada de los péptidos antigénicos tumorales por las moléculas de MHC I en la superficie de las células dendríticas[109, 110] .

En un cuarto paso se desarrolla la respuesta inmune adaptativa al tumor para identificar y eliminar las células tumorales. Las células T CD8+ y T CD4+ participan directa o indirectamente en el proceso de lisis de las células tumorales. Las células T CD4+ producen IL-2 e IL-15 para mantener la actividad y función de las células T CD8+. Las células T CD8 + pueden inducir directamente la muerte de las células tumorales por citotoxicidad o indirectamente mediante la liberación de IFN- γ . Estas dos formas de eliminar el tumor pueden ocurrir al mismo tiempo y no son mutuamente excluyentes. Esta fase de eliminación se repite en el cuerpo humano frente a las células neoplásicas que se producen constantemente. Esto también explica por qué hay una mayor incidencia de cáncer en los pacientes de edad avanzada y con inmunodeficiencias ya que en estas dos situaciones el sistema inmunológico, especialmente la capacidad de inmunovigilancia, se ha debilitado[111, 112].

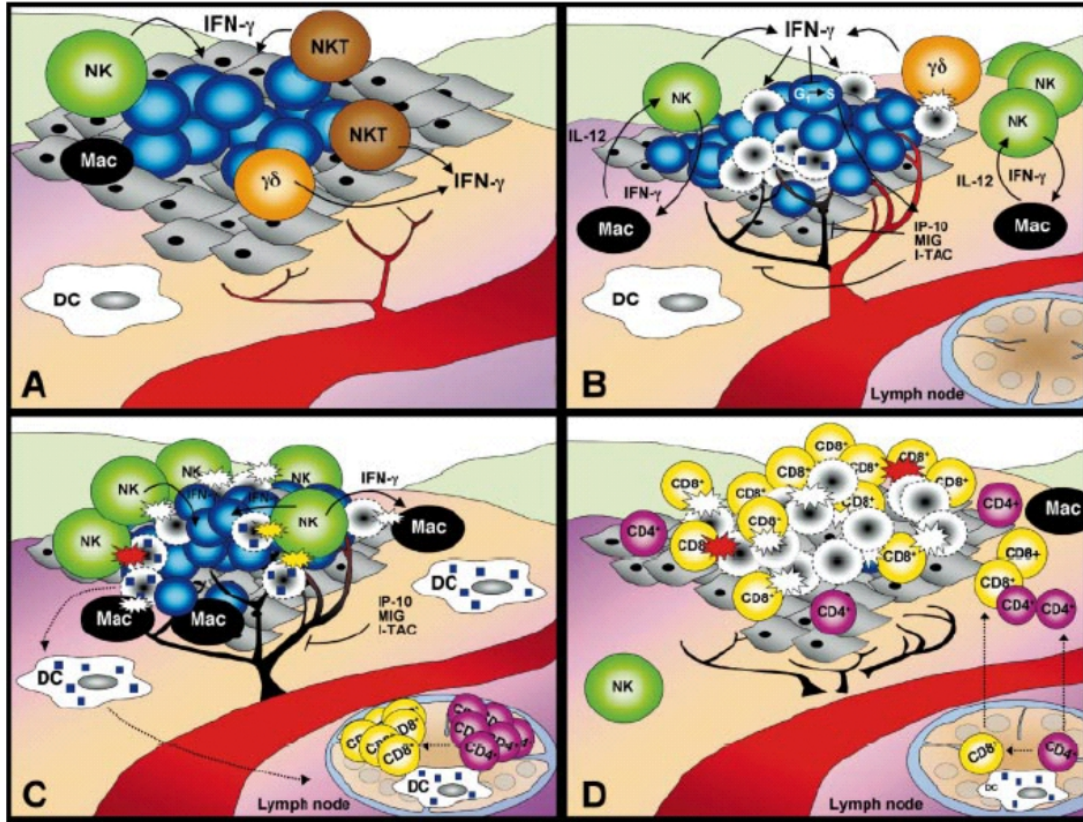


Figura 8. Modelo propuesto para la fase de eliminación del proceso de inmunoedición (a) Las células involucradas de la inmunidad innata(NK, NKT, linfocitos $\gamma\delta$) reconocen a las células anormales transformadas (células en azul) y secretan IFN- γ . (b) El IFN- γ producido por las células NK y NKT induce una reacción en cascada de la respuesta inmune natural que conduce a la producción de una gran cantidad de quimiocinas para reclutar macrófagos y células dendríticas . (c) Las células dendríticas que han captado antígenos tumorales migran a los ganglios linfáticos y los presentan a las células T CD4 + y CD8 + para activar la respuesta inmunitaria adaptativa (d). Los linfocitos T CD4 + y CD8 + activados alcanzan los sitios del tumor bajo la guía de quimiocinas y reconocen y destruyen a las células tumorales que expresan antígenos tumorales específicos.(Dunn et al. Annu.Rev.Immunol. 2004, 22: 329-60).

- b) Fase de Equilibrio. Las células tumorales que sobreviven al ataque inmunológico alcanzan un equilibrio dinámico. En esta fase, los linfocitos solo pueden mantener este estado de equilibrio, pero no tienen la capacidad de eliminar completamente a las variantes tumorales. Las células tumorales que sobreviven están adaptadas frente a la respuesta del sistema inmunológico y tienen las características de ser inestables genéticamente, con mayor número de mutaciones y menor inmunogenicidad pero se mantienen dentro de un cierto control inmunológico que no las destruye pero que impide su expansión. Esta fase dura más que las fases de eliminación y escape y puede mantenerse durante un intervalo de varios años en personas normales. Por ejemplo,

muchos tumores sólidos tienen un período de tiempo superior a los 20 años desde el inicio de la formación del tumor hasta la detección clínica. [113]. Como ejemplo, un donante de riñón al que le diagnosticaron un melanoma 16 años antes de su muerte, vivió libre del tumor y la causa de su muerte fue un accidente de tráfico. Tras su muerte, se donaron los dos riñones que se trasplantaron a dos receptores. En ambos receptores 1-2 años después del trasplante de riñón se desarrollaron metástasis renales de melanoma que tenían la huella genética del donante. Esto se debe a que los receptores fueron tratados con fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo del injerto, lo que provocó la disminución de su propia función del sistema inmunológico, que facilitó el crecimiento de las metástasis latentes renales rompiéndose la fase de equilibrio para entrar rápidamente en el período de escape del tumor [114].

c) En la fase de escape las células tumorales supervivientes no pueden ser eliminadas por las células inmunitarias y tienen una alta capacidad de proliferación e invasión. Estas células tumorales evaden la detección y eliminación por las células inmunes y rompen el equilibrio anterior después de cambiar su genoma y/o su patrón de expresión génica, se expanden y finalmente se desarrollan en tumores clínicamente detectables. Las células tumorales evaden las respuestas inmunitarias de la inmunidad innata y adquirida mediante diversas estrategias inmunoevasivas [76].

1.2.3. Mecanismos de escape tumoral

Las células tumorales escapan principalmente por dos mecanismos: bloqueo de la activación de las células inmunitarias con función antitumoral y evasión del ataque del sistema inmunológico.

1.2.3.1. Ausencia de coestimulación

Cuando los tumores se forman y desarrollan en el cuerpo, las células tumorales se encuentran en un microambiente no-inflamatorio, en donde las células tumorales no producen la activación del sistema inmunitario. Por tanto, aunque las células dendríticas (DCs) pueden reconocer antígenos tumorales, no pueden activarse y madurar en este microambiente no-inflamatorio, por lo

que no pueden iniciar el proceso de activación y diferenciación de las células inmunitarias anti-tumorales. Además, las células tumorales no expresan moléculas coestimuladoras en su superficie, lo que conduce a la anergia de las células T que tienen la capacidad de reconocerlas [115].

1.2.3.2. Defecto de transducción de señal del receptor de muerte celular (Apoptosis)

Fas-ligand (Fas-L) y TRAIL son dos ligandos de receptores de muerte celular (apoptosis), [116, 117]. La señalización anormal o ausente de esta vía contribuirá a la supervivencia y proliferación de las células tumorales. La transmisión de la señal en cascada de la caspasa 8 es muy importante en la apoptosis. Al expresar el inhibidor de la caspasa 8 (cFLIP), varios tumores pueden resistir la apoptosis mediada por el receptor de muerte y las células tumorales pueden sobrevivir [88]. Además, las células tumorales con alta expresión de cFLIP son resistentes a las células T CD8+ citotóxicas in vivo [118].

La expresión anormal o ausente de Fas en la superficie de las células tumorales puede hacer que resistan la apoptosis inducida. Se han encontrado mutaciones de genes que codifican Fas en el linfoma de tipo no-Hodgkin, el mieloma múltiple y el melanoma, que conducen a una función anormal de los receptores de muerte y contribuyen a la supervivencia de las células tumorales [119-121]. La expresión anormal de TRAIL causada por varios mecanismos también puede causar resistencia a la apoptosis [122].

1.2.3.3. Apoptosis de linfocitos T activados

Las células tumorales expresan el ligando del receptor de muerte FAS-L (ligando de Fas) que conduce a la apoptosis de los linfocitos T activados y facilita el escape de las células tumorales [123]. En un estudio con muestras de cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma y carcinoma hepatocelular, después de que los linfocitos reconocieran los antígenos tumorales específicos de cada tipo de tumor en su superficie y se activaran, si las células tumorales expresaban altos niveles de Fas-L se inducía la apoptosis de los linfocitos activados o "suicidio" de los mismos lo que condicionaría el escape tumoral [124].

1.2.3.4. Citocinas inmunosupresoras

Las citocinas juegan un papel importante en la coordinación de las células del sistema inmunológico para que desempeñen sus funciones normales. Al secretar citocinas y quimiocinas, las células tumorales pueden influir en la función y maduración de las células inmunes normales, facilitando así su crecimiento y difusión[125]. Se ha encontrado que muchos tipos de tumores secretan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF no solo puede promover la formación de nuevos vasos sanguíneos y proporcionar oxígeno y nutrientes para el crecimiento tumoral, sino que también inhibe la diferenciación y maduración de las células dendríticas (DC), facilitando así el escape de células tumorales[126]. El estudio inmunohistoquímico de los tejidos del cáncer gástrico mostró que la expresión de VEGF era inversamente proporcional a la densidad de las células DC. Cuanto mayor sea la expresión de VEGF, menor será la densidad de células DC y peor será el pronóstico de los pacientes[127].

Se encontró una alta concentración de IL-10 en el suero de varios pacientes con cáncer. La IL-10 puede inhibir la diferenciación de los precursores de células DC en células DC maduras y potencia la apoptosis espontánea de células DC maduras. Además, la IL-10 puede inhibir la presentación de antígenos, la inducción de la respuesta de las células T colaboradoras y la producción de IL-12[128, 129].

Se ha encontrado una mayor expresión del factor proinflamatorio prostaglandina E (PGE2) en una variedad de tumores humanos. Esta citocina puede promover la producción de más IL-10 por macrófagos y linfocitos, y también puede inhibir la producción de IL-12 por macrófagos. Esto afecta el reconocimiento y la eliminación de las células tumorales por parte de las células inmunes[130, 131].

Se encuentra una alta concentración de TGF- β en muchos tipos de pacientes con cáncer. Esta citocina puede inhibir la actividad de los linfocitos, afectando así la progresión del tumor y provocando que los protocolos de inmunoterapia sean menos eficientes[132].

1.2.3.5. Alteraciones en la expresión de las moléculas HLA de clase I

Se ha encontrado una pérdida parcial o total de la expresión de la molécula de HLA de clase I

en una gran variedad de tumores, como el melanoma, el adenocarcinoma de próstata y el cáncer de colon. Debido a que las moléculas de HLA-I pueden modular la sensibilidad de las células tumorales a la lisis de las células NK y de las células CTLs, la pérdida de su expresión en la superficie de las células tumorales tiene una gran influencia funcional. La pérdida de moléculas de HLA de clase I es el mecanismo más importante para que las células tumorales escapen a la inmunovigilancia, que puede facilitar la invasión y la diseminación metastásica de las células tumorales [133, 134].

1.3. Antígenos de melanoma

El melanoma es un cáncer muy letal que se deriva de los melanocitos dérmicos transformados. El melanoma primario diagnosticado precozmente puede ser curable, pero la tasa de curación de las etapas más avanzadas es limitada, con una alta tasa de mortalidad. Con la progresión del tumor, los melanocitos sobreexpresan moléculas intracelulares o de la superficie celular, incluidas proteínas ectópicas normales y específicas del tumor. Algunas de estas moléculas inducen una respuesta inmunitaria específica por parte de los linfocitos T y B. Se ha propuesto la utilización de anticuerpos producidos contra antígenos de melanoma para el diagnóstico diferencial de enfermedades, la estadificación, el pronóstico y la evaluación de la eficacia del tratamiento [135].

1.3.1. Antígenos asociados al melanoma

Se supone que una amplia gama de antígenos de células tumorales tienen implicaciones valiosas como herramientas de diagnóstico y como diana de la inmunoterapia. Una selección de antígenos que se han probado extensamente pueden servir como candidatos principales para la inmunoterapia del cáncer en general y específicamente para el melanoma [136].

1.3.1.1. Antígenos de linaje / diferenciación de melanocitos: proteínas asociadas con la síntesis de melanina

Los antígenos de diferenciación de melanocitos (MDA) son proteínas normales no mutadas

expresadas exclusivamente en melanomas y melanocitos normales en diferentes etapas de diferenciación, que están involucradas en los pasos enzimáticos de la melanogénesis (Figura 9)[137, 138]. Los MDA se expresan en gran medida en la mayoría de los melanomas primarios y metastásicos [138, 139]. Sin embargo, aún no se ha demostrado su papel activo en el desarrollo del cáncer. Se localizan en los melanosomas, los orgánulos en los que se sintetiza y almacena la melanina [140, 141]. Estos antígenos se expresan en los melanocitos epidérmicos y el epitelio pigmentado de la retina, el iris y el cuerpo ciliar del ojo [142, 143] y proporcionan marcadores altamente específicos y sensibles para la diferenciación de melanocitos. Estos antígenos incluyen a la tirosinasa, las proteínas relacionadas con tirosinasa (TRP-1 y TRP-2), el antígeno de melanocitos (melan-A / MART-1) y la glicoproteína 100 (gp100)[137, 139, 144].

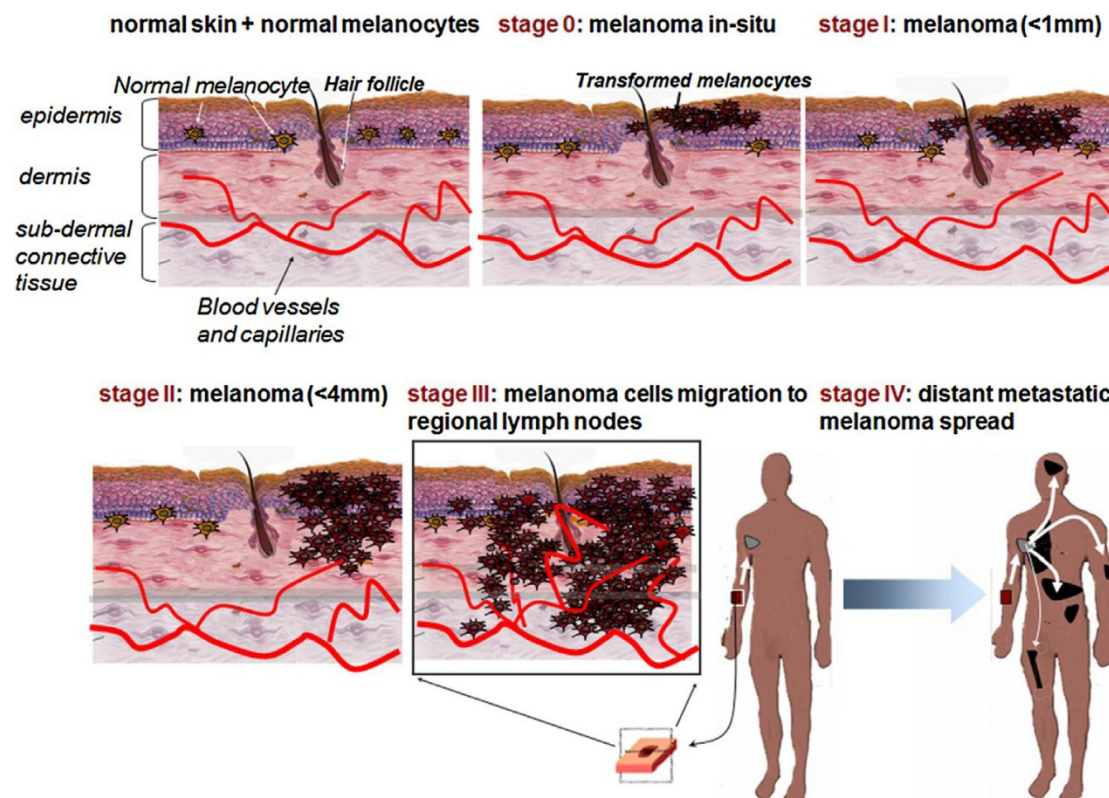


Figura 9. La progresión patológica del melanoma se inicia desde los melanocitos cutáneos transformados superficiales primarios. Representación de las etapas del desarrollo y la progresión del melanoma a través de la fase inicial de crecimiento radial (RGP, estadio I) con la progresión posterior del tumor a la fase de crecimiento vertical (VGP, estadio II) El progreso del crecimiento local del melanoma seguido de la interacción con la circulación, conduce a las etapas metastásicas de la enfermedad (etapas III y IV) (Pitcovski et al. Crit Rev Oncol Hematol 2017;115: 36-49.)

Los linfocitos, que pueden detectar los péptidos antigénicos de los antígenos de

diferenciación, están presentes en la masa tumoral como linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) [145, 146]. Los TIL dirigidos contra estos autoantígenos expresados en células de melanoma pueden mediar la regresión tumoral, asociada con la ruptura de la tolerancia inmunológica frente al tumor [147, 148]. Esto sugiere la posible inducción de células T citotóxicas para una respuesta inmune anti-melanoma. Por lo tanto, los antígenos de diferenciación / linaje de melanocitos se han identificado como dianas de células TH1 CD4+ (Helper cooperadoras) y células T CD8+ citotóxicas [146, 149] y como tales, se han convertido en un objetivo de la inmunoterapia activa contra el melanoma [150].

Dado que los antígenos de diferenciación que se expresan normalmente no son específicos del tumor, el uso de estas moléculas para la inmunoterapia del cáncer puede inducir autoinmunidad frente los tejidos normales correspondientes. Así, la aparición de vitíligo, un síntoma autoinmune como efecto secundario adverso de este tratamiento, se debe a que la respuesta inmune se dirige también hacia los melanocitos normales. Pero esto también predice una respuesta significativa asociada con una mayor probabilidad de éxito de la terapia contra el melanoma [151].

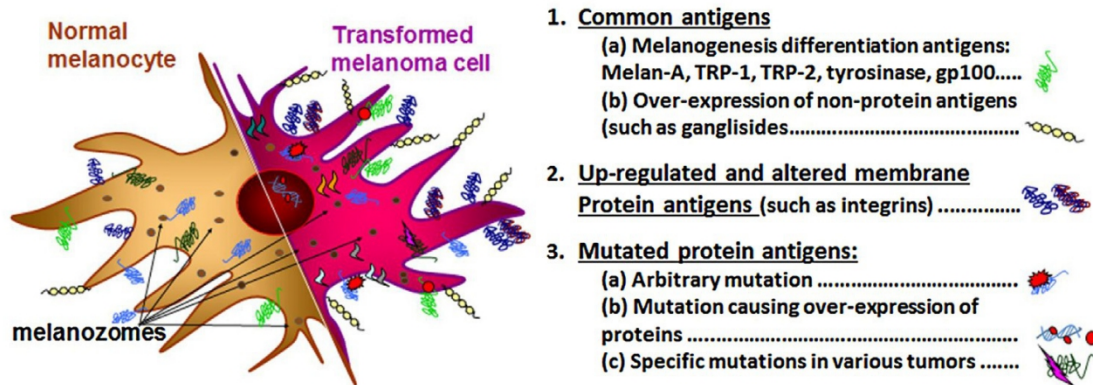
Se han generado anticuerpos monoclonales contra marcadores de diferenciación tumoral en células transformadas. Estos anticuerpos se utilizan con fines de diagnóstico, por ejemplo, en inmunohistoquímica [139]. Sin embargo, dado que los antígenos relevantes son principalmente intracelulares, el uso de estos anticuerpos para la inmunoterapia es controvertido [139, 152, 153].

1.3.1.1.1. Tirosinasa

La tirosinasa, una enzima glicosilada que contiene cobre, juega un papel clave en la ruta de síntesis de melanina en muchos hongos, plantas y animales [154, 155]. La tirosinasa humana está unida a la membrana de los melanosomas [140, 141]. La secuencia N-terminal que contiene el sitio catalítico mira hacia el lumen, mientras que un dominio C-terminal está expuesto hacia el citoplasma y puede ser escindido [140]. La tirosinasa se expresa en los nevos y en el 80% -90% de los melanomas primarios y metastásicos [137, 138, 156] por lo que es un marcador diagnóstico

[139]. Células T CD4+ auxiliares y CD8+ citotóxicas específicas de tirosinasa se han aislado en pacientes con melanoma [157-159] que son capaces de inducir la destrucción in vitro de las células tumorales autólogas [158, 159]. La vacunación con péptidos de tirosinasa aumentó la frecuencia y actividad de linfocitos T específicos en pacientes de melanoma. [160, 161].

A. Antigens in melanocytes and melanoma cells



B. Oncofetal / Cancer testis families of antigens (CTA)



Figura 10. Resumen esquemático de la clasificación y localización de las principales moléculas antigénicas del melanoma, así como de otros antígenos tumorales y oncofetales compartidos con el melanoma.(Pitcovski et al. Crit Rev Oncol Hematol 2017;115: 36-49.)

1.3.1.1.2. TRP-1 y TRP-2

TRP-1 (gp75) interviene en la proliferación y diferenciación de los melanocitos [162]. TRP-1 se expresa en la fase de crecimiento radial pero no en el estadio de melanoma de la fase de crecimiento vertical [163]. TRP-1 y TRP-2 se expresan en los melanocitos y en la mayoría de los melanomas [164, 165]. La sobreexpresión de TRP-2 contribuye a la resistencia intrínseca del Melanoma maligno a la quimioterapia y la radioterapia [166]. Por otro lado, están asociados con la ruptura de la tolerancia inmune a los melanocitos y por lo tanto, con la inducción de inmunidad

celular y humoral .Actualmente se han iniciado nuevas terapias frente al melanoma basadas en anticuerpos monoclonales que reconocen TRP1 [167].

1.3.1.1.3. Melan-A

Melan-A, también denominada MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por las células T), es una pequeña proteína transmembrana de dominio único que se expresa exclusivamente en los melanocitos de la piel y la retina [168]. Melan-A juega un papel importante en la expresión, estabilidad, tráfico y procesamiento de la proteína de melanocitos gp100 y también está involucrada en la biogénesis del melanosoma en etapa II [169]. Se expresa en todos los nevus y en la mayoría de los melanomas primarios y metastásicos, así como en algunos otros tumores [156, 170]. La Melan-A es una proteína asociada a melanoma y parte de sus secuencias peptídicas podrían ser reconocidas por linfocitos T citotóxicos autólogos[146].

1.3.1.1.4. gp100

gp100, también denominada Pmel17 (proteína premelanosomal), es una proteína transmembrana de tipo I compuesta por un dominio luminal largo y un dominio citoplásmico corto que están separados por un solo dominio transmembrana. La proteína adopta una estructura fibrilar en el melanosoma y forma estructuras de tipo amiloide [171]. gp100 está presente en melanocitos normales y células pigmentadas en la retina, así como en la mayoría de los melanomas [169, 170]. gp100 tiene un papel en la melanogénesis temprana, la biogénesis del melanosoma y la polimerización de la melanina [172]. Los anticuerpos anti-gp100 (por ejemplo, HMB-45) se utilizan con fines de diagnóstico. Se han utilizado células dendríticas pulsadas con péptidos derivados de gp100 para la terapia del melanoma en combinación con quimioterapia [173].

1.3.1.2. Antígenos oncofetales expresados en cáncer y testículo

Los antígenos de cáncer y testículo (CTA) se expresan en una variedad de tumores, incluidos

los melanomas (Figura 10). Las funciones biológicas de la CTA no se han estudiado completamente, pero se sugiere que dirigen la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células de la línea germinal humana y pueden tener efectos similares en las células cancerosas [174, 175]. En tejidos normales, los CTA se expresan principalmente en trofoblastos placentarios, en células germinales testiculares en diversas etapas de la espermatogénesis y en células epiteliales tímicas medulares [176, 177]. Algunos CTA también se expresan en el sistema nervioso central, la glándula suprarrenal y otros tejidos somáticos, principalmente en sus etapas de desarrollo [175, 176]. La expresión de CTA en adultos puede estar correlacionada con la aparición de diferentes cánceres. Se desconoce el papel de estos grupos de proteínas en el proceso de transformación celular asociado al desarrollo del melanoma. Dado que la expresión de CTA generalmente se restringe a las células germinales, que no expresan moléculas de HLA, son potencialmente adecuadas para la inmunoterapia específica del cáncer mediada por células T citotóxicas (Figura 10) [174, 178].

Krishnadas et al. 2013 discutió la utilización de terapias basadas en CTA en ensayos clínicos y los anticuerpos producidos contra ellos pueden servir para el diagnóstico molecular. Sin embargo, dado que los CTA son predominantemente moléculas intracelulares, tales anticuerpos no pueden servir para inmunoterapia [179].

La familia de proteínas CTA está compuesta por más de 80 miembros, pero los más estudiados para la inmunoterapia contra el cáncer son el antígeno asociado al melanoma (MAGE), el antígeno BM-1 (BAGE), el antígeno G (GAGE), NY-ESO-1 y SSX-2 [180].

1.3.1.2.1. La familia MAGE

Según su patrón de expresión en los tejidos, la familia de antígenos MAGE se divide en dos subfamilias: MAGE-I y MAGE-II. Aunque las funciones exactas de las proteínas MAGE aún no están claras, los datos acumulados sugieren que tienen un papel en la regulación de la progresión del ciclo celular y la restricción de la apoptosis, lo que puede contribuir a su función tumorigénica [181]. La subfamilia MAGE-I (MAGE A, B, C) consta de proteínas específicas de tumores que pertenecen al grupo CTA. Por el contrario, las proteínas que pertenecen a la subfamilia MAGE-II

(MAGE D) se expresan de forma ubicua. En la actualidad, se han identificado 23 miembros de la familia de genes MAGE-I [177]. Los péptidos procesados a partir de estas proteínas son presentados por HLA y son reconocidos por células T CD8+ citotóxicas autólogas [182], lo que hace que estas moléculas sean candidatas para inmunoterapia basada en células [183]. La expresión de las proteínas MAGE-I en las células tumorales está asociada con un aumento de la tumorigénesis, así como con un mal pronóstico [184]. La expresión elevada de MAGE se ha descrito en otros tumores malignos distintos del melanoma [185].

1.3.1.2.2. La familia BAGE

La familia BAGE consta de varios polipéptidos altamente homólogos (90% -99%) que contienen péptidos que pueden interactuar con un alelo específico de HLA y activar células T citotóxicas [186]. La expresión de BAGE-I se ha descrito en el 31% de los melanomas metastásicos, lo que sugiere que podría servir como diana para la inmunoterapia de células T así como como marcador de progresión tumoral [187].

1.3.1.3. La familia GAGE

La familia de proteínas GAGE consta de al menos 16 miembros de proteínas ácidas oligoméricas, que normalmente se expresan solo en las células germinales y en las células tumorales [175]. Como tales, las proteínas GAGE son moléculas marcadoras útiles para el diagnóstico y pronóstico del melanoma, así como de otros cánceres [175, 188, 189]. La expresión de proteínas GAGE en el cáncer se correlaciona con un mal pronóstico [190]. En el melanoma, las proteínas GAGE pueden provocar respuestas humorales y un péptido derivado cuando se presenta por HLA Cw *06:01 puede inducir respuestas de células T CD8+ citotóxicas en individuos con el haplotipo relevante [175, 191]. Sin embargo, como los tumores pueden contener una mezcla de células GAGE positivas y GAGE negativas, las células tumorales GAGE negativas pueden escapar a la inmunoterapia basada en el reconocimiento del péptido derivado de GAGE [175].

1.3.1.3.1. NY-ESO-1

NY-ESO-1 no tiene homología con ninguna otra proteína conocida [192]. Está considerado como uno de los CTA más inmunogénicos. En varios tumores, las respuestas inmunitarias humorales a NY-ESO-1 se observan con más frecuencia que para la mayoría de los otros CTA, lo que significa que NY-ESO-1 es altamente inmunogénico [193]. Esto con frecuencia resulta en respuestas inmunológicas espontáneas y control espontáneo de tumores [194]. En los últimos años se están acumulando más pruebas de péptidos de NY-ESO-1 presentados por alelos HLA y su reconocimiento por células T [192, 195].

1.3.1.3.2. SSX-2

La familia de proteínas SSX (también conocida como HOM-MEL-40) incluye al menos 10 miembros con un alto grado de homología. La expresión de SSX en tumores se asocia con estadios avanzados y pronóstico desfavorable [196]. Los miembros de la familia SSX no se limitan al melanoma y se expresan de forma heterogénea en muchos otros cánceres [196, 197]. Algunas de las proteínas SSX inducen respuestas inmunitarias humorales y celulares espontáneas en pacientes con melanoma [196, 198]. Utilizando un epítipo específico de SSX-2, se provocó una respuesta inmunitaria de células T citotóxicas en pacientes con melanoma que expresaban el alelo HLA-A2 [196]. Como las proteínas SSX se expresan solo en algunas células de los tumores primarios y las metástasis, muchos tumores escapan a la inmunoterapia dirigida contra estas proteínas [196, 199].

1.3.1.4. Proteínas de la membrana celular

La expresión de los receptores de adhesión celular está regulada al alza en el melanoma y facilita los contactos célula-matriz o célula-célula con la transducción concomitante de señales que contribuyen al crecimiento, migración e invasión de las células tumorales (Figura. 10) [200].

Los receptores más estudiados en el melanoma son las integrinas, el condroitín sulfato proteoglicano (MCSP), las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas, la melanotransferrina (MTf) y el S100. Dado que las proteínas asociadas a la membrana pueden

servir como diana antigénica de anticuerpos específicos, podrían considerarse como una base para tratamientos asociados con anticuerpos o para ser dianas de receptores de antígenos quiméricos (CAR) para dirigir CTL específicos a células tumorales [201, 202].

1.3.1.4.1. Integrinas

Las integrinas son receptores de heterodímeros compuestos por subunidades α y β . Cada una de estas subunidades consta de un gran dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplásmico [203]. En células y tejidos normales, las integrinas median la señalización intracelular para la inducción de la unión de las células a la matriz extracelular (MEC), así como su diferenciación, proliferación, migración y supervivencia [203, 204]. Se han identificado dieciocho subunidades α y ocho β y se han apareado para formar 24 receptores heterodiméricos de integrina diferentes [204]. Dado que cada tipo de emparejamiento de integrinas actúa de manera diferente, los cambios en la composición de heterodímeros de las diversas subunidades α y β en las células malignas a medida que avanza el tumor permiten que las integrinas regulen la actividad de las células tumorales, incluida la invasión y migración, al tiempo que previene la apoptosis que suele ocurrir en células normales dependientes de la matriz extracelular [204, 205]. Las expresiones de las diferentes subunidades α y β aumentan o disminuyen en las diferentes etapas del cáncer [204–206]. Por ejemplo, $\beta 3$ se expresa en melanoma primario y metastásico en la transición de la fase de crecimiento radial a la fase de crecimiento vertical (Figura 9) pero no en melanocitos normales, mientras que $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 5$ emparejados con $\beta 1$ se sobreexpresan en las células transformadas del melanoma [205].

Otras integrinas contribuyen a la función de las células no cancerosas en el microambiente tumoral que apoyan el desarrollo eficiente del tumor [204–206]. Las combinaciones específicas de complejos de integrina que se encuentran elevados en el cáncer pueden servir como objetivos potenciales para fármacos antitumorales [207, 208].

1.3.1.4.2. MCSP

MCSP, también conocido como condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), es una molécula transmembrana de la superficie celular que se expresa en gran medida en la mayoría de los melanomas humanos, aunque también se expresa en niveles mucho más bajos en los melanocitos

normales [209, 210]. Está presente como una glicoproteína o un proteoglicano unido a cadenas de sulfato de condroitina-4. En condiciones normales, los proteoglicanos son producidos por células que secretan ECM [210]. La MCSP está involucrada en la proliferación celular y está asociada con la regulación de la migración de células endoteliales y el control de la morfogénesis de microvasos en el proceso de revascularización [210, 211]. En el melanoma, la MCSP desempeña un papel en la estabilización de las interacciones entre las células y la ECM durante las primeras etapas de la propagación de las células del melanoma en las membranas basales endoteliales y participa en la migración, invasión y supervivencia de las células del melanoma. La elevación del nivel de fragmentos de MCSP podría detectarse en el suero de pacientes con melanoma [209, 210].

1.3.1.4.3. Moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas

Los miembros de las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas están presentes en la superficie celular y participan en la adhesión célula-célula y el reconocimiento intercelular. Las proteínas más sobreexpresadas de este grupo en células de melanoma son MUC18, también denominada molécula de adhesión celular de melanoma (Mel-CAM) o CD146 y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Aunque la función biológica de CD146 aún no está establecida [212, 213], existen indicios de que puede interactuar con las células endoteliales asociadas con la angiogénesis tumoral. El CD146 es un marcador altamente sensible que lo presentan las células en la mayoría de los melanomas avanzados y metastásicos, pero no los melanocitos normales, lo que lo convierte en un marcador de progresión tumoral y diseminación metastásica [139, 212]. Pero dado que también puede expresarse en células de algunos tejidos normales, subconjuntos de linfocitos y en varios tipos de tumores su especificidad para el melanoma es baja [139, 212-214].

ICAM-1 se expresa en células normales y es el ligando del antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1) [215, 216]. Su expresión en células de melanoma primario y metastásico puede desempeñar un papel en la interacción de estas células tumorales con linfocitos que expresan LFA-1 [216]. El grado de expresión de ICAM-1 en células de melanoma y la correlación de su nivel sérico con la progresión del tumor en asociación con el pronóstico, son controvertidos [215-217].

1.3.1.4.4. MTf (Melanotransferrina)

MTf, también conocida como p97, es una glicoproteína transportadora de hierro unida a la membrana con dos dominios extracelulares. Se expresa en cantidades bajas en tejidos adultos normales y en niveles más altos en tejido fetal y nevus pigmentados benignos, así como en el 90% de las células melanoma maligno y en el cáncer de mama triple negativo (TNBC). Los tres epítomos altamente inmunogénicos de la proteína MTf se encuentran en su dominio N-terminal. Aunque muestra una alta inmunogenicidad, el anticuerpo monoclonal anti-MTf para la inmunoterapia contra el cáncer todavía se limita a las etapas preclínicas tempranas de los ensayos clínicos [218].

1.3.1.4.5. Proteínas S100

La familia de proteínas S100 consta de al menos 25 miembros [219]. Las proteínas S100 pueden formar homodímeros, heterodímeros y oligómeros. Los miembros de esta familia participan en la regulación de la motilidad celular, el crecimiento y la diferenciación, la contracción, la progresión del ciclo celular, organización estructural de membranas, transcripción, dinámica de los componentes del citoesqueleto, fosforilación de proteínas y protección frente al daño celular oxidativo [219, 220]. El S100 es uno de los primeros marcadores de melanoma aceptado como herramienta de diagnóstico de melanoma [221]. Se han descrito niveles de expresión alterados de proteínas S100 en muchos otros cánceres, así como en una amplia gama de otros trastornos humanos, como enfermedades inflamatorias, miocardiopatías y síndromes neurodegenerativos [139, 219]. Se demostró que algunos subtipos de S100 se asocian con la diseminación metastásica, mientras que otros actúan como supresores de tumores [220]. Proteínas de la familia S100 se expresan en todos los subtipos de melanoma. Los anticuerpos policlonales o monoclonales contra algunos miembros de la familia S100 se utilizan para detectar los melanomas por inmunohistoquímica [139]. S100 B es un marcador clínico importante para la estadificación, el pronóstico, la evaluación de los resultados del tratamiento y el crecimiento metastásico. Dado que también se expresan en otros tumores, se utilizan como herramientas de diagnóstico sólo en asociación con otros marcadores de melanoma más específicos, como gp100 o melan-A [224].

1.3.2. Antígenos de genes mutados- neoantígenos

Después de mutaciones somáticas en las células tumorales en división, pueden surgir nuevos epítopos relacionados con el tumor, que pueden inducir respuestas inmunes antitumorales (Figura. 10) [200]. Estos nuevos antígenos tumorales se pueden clasificar como sigue :

1.3.2.1. Antígenos presentes de forma única en tumores individuales y rara vez compartidos por diferentes pacientes

El análisis genético de tumores revela de cientos a miles de mutaciones por muestra [225]. Estos son antígenos únicos y específicos de tumores en células tumorales individuales y no se expresan en células normales. Pueden ser aleatorios (que ocurren esporádicamente en las células) y pueden formarse como resultado de mutaciones puntuales [225, 226]. Una célula cancerosa individual muestra 1000–3000 mutaciones aleatorias, que suman hasta 10^{12} mutaciones esperadas en un tumor compuesto por 10^9 células [227]. Estas mutaciones pueden inducir una respuesta inmune antitumoral, pero por lo general no se pueden utilizar como dianas inmunoterapéuticas o de diagnóstico, ya que como mutaciones que ocurren al azar son compartidas solo por una subpoblación celular pequeña en el tumor [226].

1.3.2.2. Mutaciones clonales

Las mutaciones clonales están presentes en la mayoría, si no en todas, las células tumorales. Tales mutaciones pueden servir como valiosas dianas inmunológicas para la terapia [227]. Una de esas mutaciones adquiridas en el melanoma se encuentra en B-raf, que es una tirosín quinasa que inicia la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPs) [228]. B-Raf mutada se encuentra en 40% a 60% de los tumores de melanoma cutáneo en desarrollo [229]. Aproximadamente el 90% de las mutaciones en B-Raf implican un cambio de valina a ácido glutámico en el codón 600 (denominado V600E) [230]. Esto cambia la conformación de la proteína e induce una actividad 478 veces mayor de la quinasa B-Raf. Se demostró que el

protooncogén B-Raf media el silenciamiento epigenético generalizado en el cáncer colorrectal y el melanoma [231]. Las mutaciones asociadas al melanoma clonal se han considerado un objetivo del melanoma metastásico después de la transferencia de células T autólogas que reconocen múltiples antígenos tumorales mutados [232]. La identificación de TIL citotóxicos que reconocen mutaciones clonales podría ser eficaz para terapias adoptivas y vacunas personalizadas [233].

1.3.2.3. Antígenos mutados sobreexpresados

Se han identificado varias mutaciones que inducen la sobreexpresión de proteínas en cánceres y en aproximadamente el 70% de los melanomas examinados [234]. Se identificaron dos mutaciones independientes dentro del promotor central de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), el gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa. Estas mutaciones aumentan la actividad transcripcional de los telómeros de 2 a 4 veces, lo que permite la proliferación continua indefinida de las células en el tumor en crecimiento y retrasa su senescencia [234, 235].

1.3.3. Antígenos no proteicos asociados a tumores

En muchos cánceres, la glicosilación es anormal y contribuye a la señalización, adhesión y metástasis de las células cancerosas [236]. Los antígenos de carbohidratos aumentan su expresión en la superficie de muchas células tumorales y, como tales, pueden ser candidatos para vacunas contra el cáncer (Figura 10). Uno de los grupos más estudiados de este tipo de moléculas en el melanoma son los gangliósidos, que se encuentran presentes como glucoesfingolípidos complejos con uno o varios residuos de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) [237]. La familia de los gangliósidos está compuesta por más de 30 moléculas. Algunos gangliósidos están implicados en interacciones célula-célula y célula-matriz [237, 238]. Los más estudiados de estos antígenos son GM2, GD2, GM3, GD3 y O-acetil-GD3, que normalmente abundan en las membranas celulares neuronales [237].

GM2 y GD2 están presentes en la mayoría de los melanomas, en contraste con su expresión restringida en los tejidos cutáneos normales [239]. Aunque la forma clásica N-acetilada de GM3 se encuentra tanto en células normales como en células tumorales, la expresión de gangliósidos atípicos (de-N-acetil GM3 y N-glicolil GM3) se encuentra solo en células de melanoma [51,

240].

La respuesta inmune a los gangliósidos es pobre, debido a su composición molecular, su estructura y la tolerancia inmunológica frente a los autoantígenos [237]. Además, como glicolípidos no proteicos, estos antígenos no se presentan a las células inmunes por las moléculas HLA de clase I o II. No pueden inducir respuestas inmunes mediadas por células T, como la muerte de células cancerosas por citotoxicidad de células T o la inducción de células B con cambio de isotipo de la Ig de superficie (BCR) , maduración de la afinidad de los anticuerpos y memoria inmunológica [237]. Por tanto, la respuesta inmune generada por los gangliósidos incluye sólo anticuerpos, principalmente del isotipo IgM [237, 241].

En general, el enfoque de inmunoterapia del cáncer basado en anticuerpos, es decir, la destrucción de células tumorales mediante anticuerpos, se basa principalmente en la inducción de la destrucción de las células reconocidas por el anticuerpo por la activación del complemento y la activación de la citotoxicidad celular mediada por los anticuerpos al estimular la acción citotóxica de las células NK y de los macrófagos que reconocen el anticuerpo unido a las células tumorales por su fragmento Fc (ADCC) (Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) . Por lo tanto, los pacientes con melanoma que tienen anticuerpos contra GM2 naturales o inducidos por la vacuna tienen un menor riesgo de recaída [242]. La vacunación de pacientes con melanoma metastásico contra N-glicolil GM3 ha mostrado respuestas antitumorales prometedoras y aumento de la supervivencia [243, 244].

1.4.Citocinas, Quimiocinas, Factores de Crecimiento y Cancer

1.4.1.Inflamación y tumor

El cáncer es un trastorno hiperproliferativo que implica transformación celular morfológica, desregulación de la apoptosis, proliferación celular descontrolada, invasión, angiogénesis y metástasis.[245] . Virchow en 1863, planteó la hipótesis de que el origen del cáncer se relacionaba con la inflamación crónica, desde entonces se han ido acumulando evidencias de que la

inflamación juega un papel fundamental en la tumorigénesis, y se ha establecido una fuerte asociación entre la infección crónica, la inflamación y el cáncer. Por ejemplo existe una fuerte asociación entre el tabaquismo, que conduce a la inflamación del pulmón y el carcinoma de pulmón; la infección por algunas cepas del VPH está asociada con el cáncer de cuello uterino; la enfermedad inflamatoria intestinal se asocia con el cáncer de colon y la hepatitis viral crónica está asociada con el cáncer de hígado. [246-249] Esos estudios sugieren que el microambiente inflamatorio es un componente esencial de todos los tumores y juega un papel crítico en la iniciación del tumor (el proceso por el cual las células normales se alteran genéticamente para que se vuelvan malignas), la promoción (el proceso por el cual pequeños grupos de células malignas son estimulados para crecer) y la progresión (el proceso por el cual el tumor en crecimiento se vuelve más agresivo).[250, 251]

Las células tumorales pueden reclutar un gran número de macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y células NK [252]. Las células inmunes infiltrantes del tumor juegan un papel contradictorio en el desarrollo del cáncer. Por un lado, algunas células inmunes reclutadas pueden reconocer y destruir células tumorales; pero por otro lado, la producción a largo plazo de mediadores proinflamatorios es útil para el desarrollo del tumor [253-255]. Por lo tanto, en el microambiente tumoral, existe una relación delicada entre la actividad proinflamatoria derivada del tumor y la actividad antitumoral. Estas dos actividades dependen de diferentes mediadores liberados por las células inflamatorias del huésped, las células tumorales y otros tipos de células relacionadas con el tumor, como las células endoteliales y los fibroblastos [255, 256]. Cuando la actividad antitumoral del huésped es más fuerte que la de la inmunosupresión mediada por los tumores, las células cancerosas se eliminarán y, cuando la actividad antitumoral se debilite, las células tumorales escapan y crecerán. Pero a largo plazo, el microambiente inflamatorio persistente promoverá el crecimiento y la metástasis de las células tumorales [257].

La vía de señalización de NF- κ B juega un papel importante en la promoción y progresión tumoral, y puede ser activada por diversas citocinas proinflamatorias [258, 259]. NF- κ B es un factor de transcripción, que regula la expresión de muchos genes cuyos productos pueden suprimir la muerte de las células tumorales, mejorar la transición epitelial-mesenquimal, que tiene un papel importante en la invasividad tumoral, estimular la progresión del ciclo celular tumoral y

proporcionar un adecuado microambiente para el desarrollo de tumores y ayudar a las células tumorales a invadir los tejidos circundantes y desarrollar metástasis [260, 261].

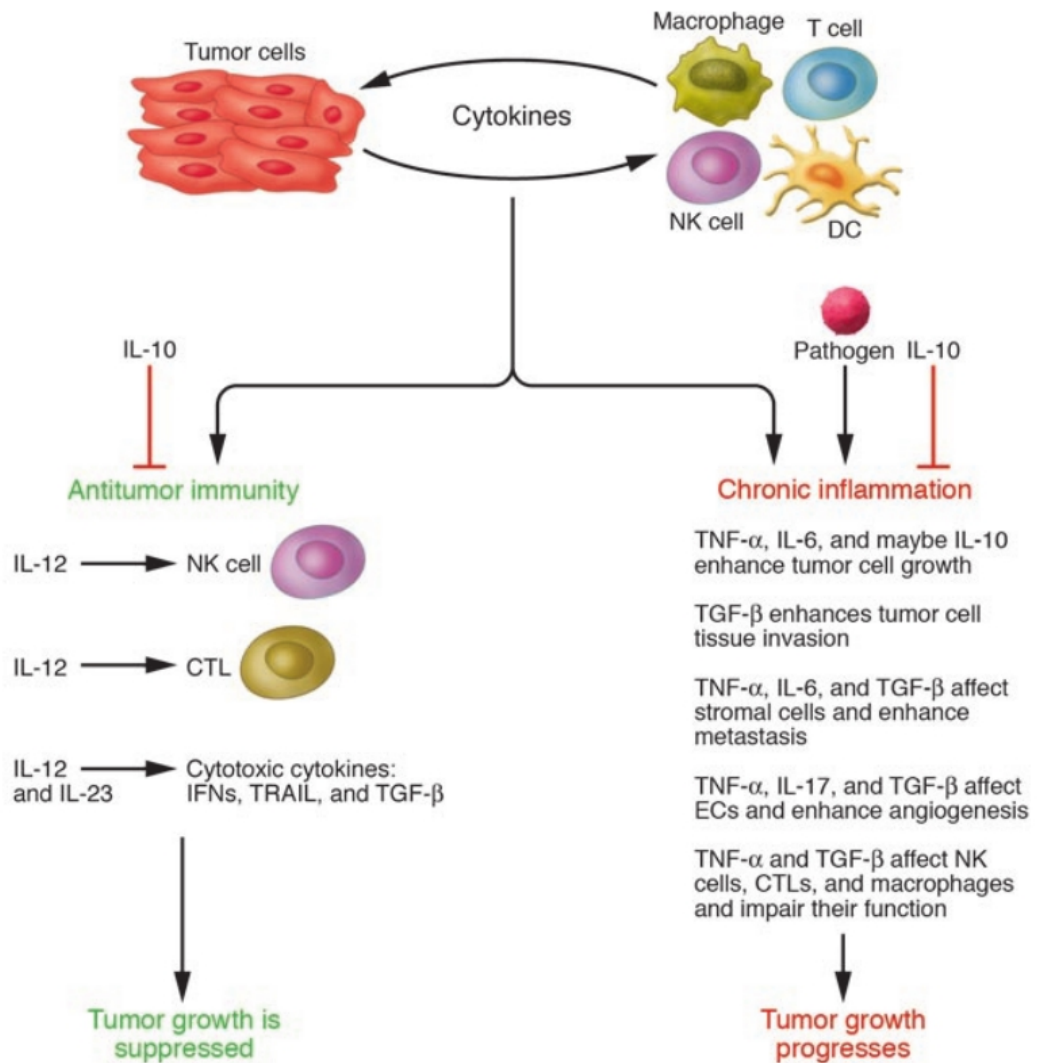


Figura 11. Esta imagen muestra que en el microambiente tumoral, las citocinas secretadas por las células tumorales y las células inflamatorias y / o inmunes que se infiltran no solo pueden desempeñar un papel antitumoral, sino también promover el desarrollo de tumores. TNF- α , IL-6, TGF- β e IL-17 en el microambiente tumoral pueden promover el crecimiento de células tumorales, la invasión a tejidos adyacentes y facilitar el desarrollo de metástasis tumorales. Por el contrario, TRAIL puede inducir directamente la apoptosis de las células tumorales, y la IL-12 y la IL-23 pueden inhibir el crecimiento tumoral al estimular los CTL y las células NK. (Lin et al. J Clin Invest 2007;117: 1175-83)

1.4.2. Algunos ejemplos de citocinas que juegan un papel importante en el desarrollo de tumores

A continuación, veremos algunos ejemplos de citocinas que juegan un papel importante en el proceso de desarrollo de tumores.

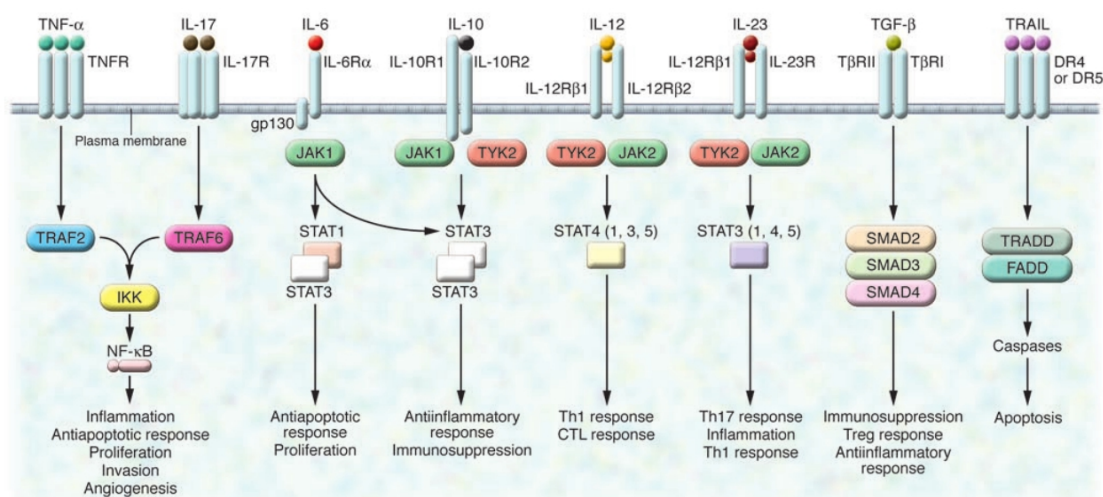


Figura 12. Vías de transducción de señales y principales respuestas biológicas de las citocinas moduladoras de la inflamación en el cáncer. Las vías de señalización mostradas pueden controlar el desarrollo de tumores a través de un efecto directo sobre las células tumorales (p. Ej., NF-κB, STAT3 y caspasas) y / o un efecto indirecto sobre las células inmunes y endoteliales (p. Ej., NF-κB, STAT3, STAT4 y SMAD). DR4, receptor de muerte 4; FADD, dominio de muerte asociado a Fas; gp130, glicoproteína 130; TRADD, proteína de dominio de muerte asociada al receptor de TNF; TRAF2, factor 2 asociado al receptor de TNF; TYK2, tirosina quinasa 2. (Lin et al. J Clin Invest 2007;117: 1175-83)

TNF-α

El TNF-α juega un papel clave en las enfermedades inflamatorias crónicas y tiene la función de promover el desarrollo de tumores[262]. El factor de necrosis tumoral (TNF) producido por células tumorales o células inflamatorias en el microambiente tumoral puede inducir genes que codifican moléculas antiapoptóticas dependientes de NF-κB, lo que ayuda a las células tumorales a sobrevivir. En un estudio del mesotelioma maligno humano inducido por amianto, se encontró que los macrófagos fagocitan el asbesto y luego liberan TNF-α que promueve la supervivencia celular y por lo tanto, reduce la citotoxicidad inducida por el amianto[263]. Al mismo tiempo, el

TNF- α puede estimular la producción de moléculas genotóxicas como el monóxido de carbono y las especies reactivas de oxígeno induciendo mutaciones en el DNA que facilitan el desarrollo del tumor [264]. La producción de TNF- α está relacionada con el mal pronóstico de carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer de vejiga [262].

El TNF- α no solo contribuye a la formación de tumores, sino que también promueve su progresión al inducir la neoangiogénesis, facilitar la invasión de los tejidos adyacentes y el desarrollo de metástasis tumorales. Además el TNF alfa inhibe la respuesta anti-tumoral de los linfocitos T y la actividad citotóxica de los macrófagos activados [265].

En los modelos de ratón de carcinogénesis cutánea, la inducción del cáncer de piel mediante la administración del carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) y promotores tumorales se obtiene una incidencia mucho mayor de tumores en ratones con TNF- α normal que ratones TNF- α deficientes a los que se le ha eliminado en la línea germinal el gen que codifica para TNF alfa [266].

TRAIL

TRAIL es producido principalmente por células T activadas y células NK y es uno de los principales mediadores de la inmunidad antitumoral. A diferencia del TNF- α , TRAIL puede inducir la apoptosis en varios tipos de células tumorales, pero solo tiene efectos insignificantes en las células normales [267]. Los ratones deficientes en TRAIL o los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes específicos de TRAIL exhiben una mayor susceptibilidad a tumores espontáneos o inducidos experimentalmente [268]. Cuando las células T se vuelven deficientes en TRAIL, se observa una menor respuesta antitumoral, un efecto huésped contra tumor mucho más débil [269]. Sin embargo, no todas las células tumorales son sensibles a TRAIL, y la activación de NF- κ B a través de TNF- α u otros factores pro-supervivencia confiere a las células tumorales resistencia a la citotoxicidad mediada por TRAIL [270].

IL-6

La IL-6 es una potente citocina inflamatoria pleiotrópica que se considera un factor clave antiapoptótico y promotor del crecimiento [271]. Se sugiere que la IL-6 tiene un papel fundamental en la patogenia del sarcoma de Kaposi[272]. Estudios recientes también sugieren una asociación entre la IL-6 circulante y un riesgo elevado de desarrollar linfoma de Hodgkin[273]. Además, un estudio del polimorfismo de su promotor asocia un SNP con la susceptibilidad a padecer cáncer de mama y con su pronóstico [274]. Además de la señalización clásica de IL-6, la secreción del receptor soluble de IL-6 (sIL-6R) puede desencadenar la señalización trans de IL-6 y participa de manera crítica en el desarrollo del cáncer de colon [275].

IL-17

La IL-17 induce el reclutamiento de células inmunes a los tejidos periféricos, una respuesta que requiere la activación de NF κ B después de la participación del receptor de la IL-17 [276, 277]. La IL-17 también conduce a la inducción de muchos factores proinflamatorios, incluidos TNF- α , IL-6 e IL-1 β , lo que sugiere un papel importante de IL-17 en la localización y amplificación de la inflamación [278, 279]. Además, el TNF- α y la IL-6, que son ambos producidos por las células Th17, no solo apoyan el desarrollo de las células Th17, sino que también sinergizan con la IL-17 para mejorar la producción de mediadores proinflamatorios. Las células de cáncer de cuello uterino humano que sobreexpresan IL-17 y las células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) muestran una capacidad sustancialmente mayor para formar tumores en ratones inmunodeprimidos en comparación con las células control con expresión de normal IL-17 [280, 281]. De manera similar, la sobreexpresión de IL-17 en líneas celulares de fibrosarcoma mejora su crecimiento tumorigénico en ratones C57BL / 6 [282]. Este efecto promotor de tumores se ha atribuido principalmente a la actividad proangiogénica de la IL-17.

IL-12

La IL-12 endógena es importante para la resistencia del huésped a los tumores; La actividad antitumoral de IL-12 se ha comprobado ampliamente en modelos de cáncer de ratón, donde inhibe la tumorigénesis e induce la regresión de tumores establecidos. Las principales actividades antitumorales de IL-12 se basan en su capacidad para promover la inmunidad adaptativa Th1 y las respuestas de linfocitos CD8+ citotóxicos (CTL) (Figura 12) [283]. El IFN- γ producido por células Th vírgenes también contribuye a la actividad antitumoral de IL-12. El IFN- γ tiene un efecto tóxico directo sobre las células cancerosas y una actividad antiangiogénica. Sin embargo, el uso de IL-12 en la terapia del cáncer se ve obstaculizado por efectos secundarios tóxicos graves, principalmente debido a los niveles extremadamente altos de IFN- γ que induce [283, 284].

IL-10

Los efectos de la IL-10 son dramáticamente opuestos a los de la IL-6, ya que la IL-10 es inmunosupresora y antiinflamatoria [285]. La IL-10 inhibe la activación de NF- κ B a través de mecanismos mal definido y en consecuencia, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-6 e IL-12[286, 287]. También se ha demostrado que la IL-10 modula la apoptosis y suprime la angiogénesis durante la regresión del tumor [288]. La expresión de IL-10 en xenoinjertos de carcinoma de ovario y de mama inhibe el crecimiento y la diseminación del tumor [289]. Se sugirió que un mecanismo por el cual IL-10 inhibe el crecimiento tumoral depende de la regulación a la baja de la expresión del MHC de clase I, lo que conduce a una mayor lisis de células tumorales mediada por células NK [288]. La inhibición del estroma tumoral contribuía a la actividad antiangiogénica de IL-10 [290]. La capacidad de IL-10 para regular negativamente la producción de VEGF, TNF- α e IL-6 también podría explicar su efecto inhibitorio sobre el estroma tumoral[288].

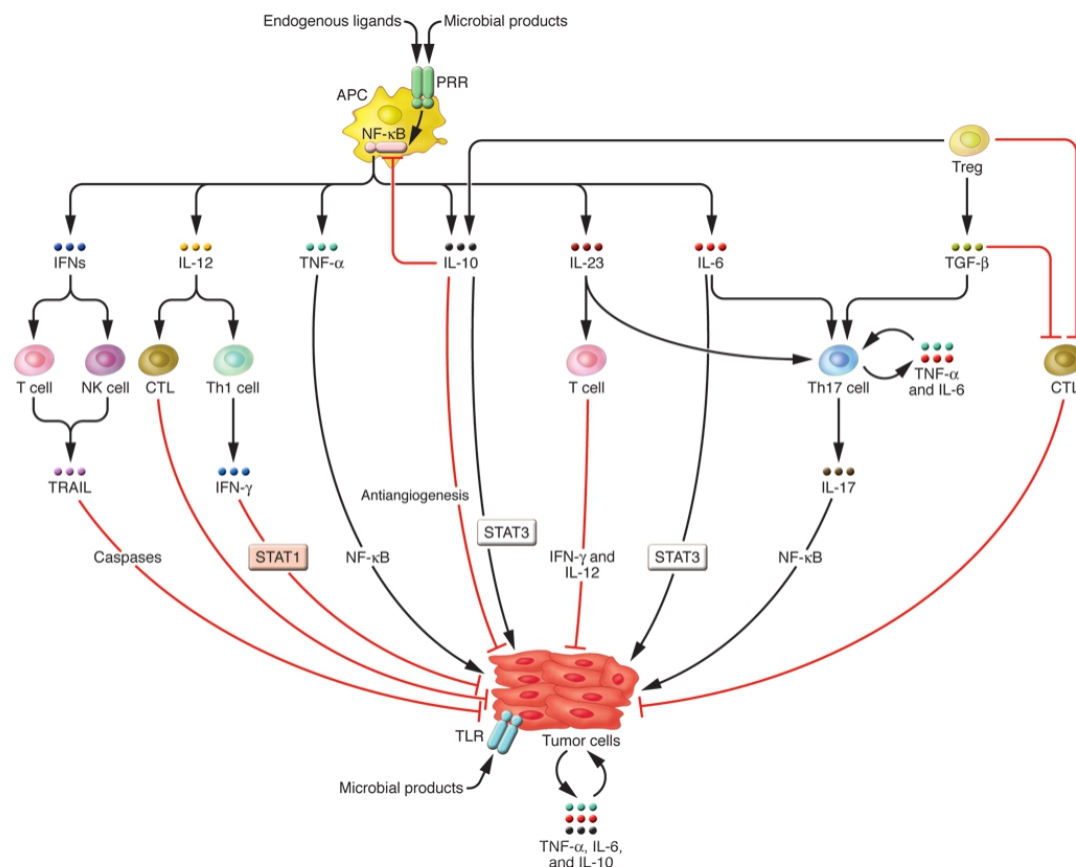


Figura 13. Las interacciones entre varios tipos de células en el microambiente tumoral determinan los efectos de las citocinas sobre el desarrollo y la progresión del tumor. Tras la infección por patógenos, las células mieloides activadas producen citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Además de sus efectos directos sobre el crecimiento, la supervivencia y las propiedades invasivas de las células tumorales, las citocinas pueden gobernar las funciones de las células Th1, las células NK, las células Tregs y las células Th17, todas las cuales infiltran el tumor. La supresión de las respuestas CTL antitumorales mediada por Treg y la inducción de respuestas mediadas por células Th17 inflamatorias contribuyen a la progresión del tumor. Paradójicamente, la IL-10 puede mediar los efectos antitumorales de las Treg. IL-23, TGF-β, IL-6 y TNF-α promueven el desarrollo de células Th17, que tienen un papel central en la coordinación de respuestas inflamatorias crónicas. IL-23 puede inducir la liberación de IFN-γ e IL-12 de las células T activadas, TNF-α e IL-12 de las APC e IL-17 de las células Th17. En ciertos casos, las células tumorales podrían producir citocinas como TNF-α e IL-6 y funcionar de manera autocrina y paracrina. (Lin et al. J Clin Invest 2007;117: 1175-83)

1.4.3. Citocinas, Quimiocina y Factores de Crecimiento en el Melanoma Maligno

El melanoma maligno humano no solo está compuesto por células malignas, sino también por varios subconjuntos de células del sistema inmunológico y del estroma, elementos vasculares y la matriz extracelular, que constituyen el llamado microambiente tumoral [291, 292]. La interacción bidireccional entre las células malignas del melanoma y los elementos del microambiente puede contribuir a la inflamación local al liberar diferentes factores solubles como citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 o TNF- α), quimiocinas (IL8, MCP-1, RANTES, GRO- α o IP-10) y factores de crecimiento (FGF-2, PDGF, GM-CSF, VEGF o TGF- β) [293-295]. Algunos estudios han descrito que la producción de estos factores por las células de melanoma no solo puede tener efectos autocrinos promoviendo la proliferación y supervivencia de las células tumorales, sino que también puede tener efectos paracrinos sobre otras células del microambiente, diseñando un medio local que favorezca el proceso de tumorigénesis [296]. Además, las células del microambiente también pueden producir factores como IL-8 o IGF-1 entre otros, que estimulan la migración, proliferación y resistencia a la terapia de las células del melanoma [292, 294, 297].

Las evidencias acumuladas en los últimos años sugieren que la producción constitutiva de factores inflamatorios como IL-1 β , IFN- γ e IP-10 en pacientes con melanoma conduce a una inmunosupresión local y sistémica, que se asocia con la progresión tumoral y metástasis [293, 298]. De hecho, la inflamación promotora de tumores se considera una de las características distintivas del inicio y la progresión del cáncer [299]. En este contexto, podríamos considerar que la producción de factores inflamatorios por parte de las células tumorales da como resultado el desarrollo de una red compleja y dinámica, que juega un papel fundamental en la patología del melanoma maligno.

1.5. Tratamiento del melanoma

1.5.1. Resección quirúrgica

Para los pacientes recién diagnosticados de melanoma primario , la extirpación quirúrgica del tumor y el tejido sano circundante es el tratamiento principal. La biopsia del ganglio linfático centinela se realiza en pacientes cuyos tumores tienen un grosor superior a 0,8 mm o son más delgados pero están ulcerados (estadio pT1b o superior). Si se encuentran células de melanoma en los ganglios linfáticos centinela, se extirpan los ganglios linfáticos que drenan el área afectada (región axilar para el miembro superior, región inguinal para la extremidad inferior) . En algunas situaciones, los tumores metastásicos también se pueden extirpar quirúrgicamente, pero el tratamiento quirúrgico en el contexto de una enfermedad metastásica conocida no pretende ser curativo y también requerirá otras opciones de tratamiento [300].

1.5.2. Quimioterapia

Para los pacientes con enfermedad metastásica, el tratamiento quirúrgico por sí solo no será curativo y las terapias con medicamentos es la siguiente línea de defensa. Hasta hace poco, las únicas opciones de tratamiento para los pacientes con melanoma metastásico eran la quimioterapia. La idea de desarrollar tratamientos químicos para el cáncer, o quimioterapias, fue explorada por primera vez a principios del siglo XX por Paul Ehrlich [300, 301]. Ehrlich teorizó que los agentes químicos podrían apuntar a subpoblaciones definidas de células, y con este fin desarrolló los primeros agentes alquilantes primitivos [302, 303].

Los descubrimientos de fármacos más recientes han mejorado enormemente el pronóstico de los pacientes con melanoma metastásico y a medida que se utilizan más las terapias dirigidas y las inmunoterapias, la quimioterapia se utiliza con mucha menos frecuencia.

1.5.3. Terapias dirigidas

Se han desarrollado múltiples terapias dirigidas para combatir los defectos moleculares presentes en el melanoma. Los más prometedores incluyen los inhibidores de BRAF (vemurafenib y dabrafenib) y los inhibidores de la quinasa MEK (cobimetinib y trametinib) que fueron aprobados para el tratamiento de melanomas metastásicos e irresecables con mutación de BRAF y MEK[301, 304]. En el melanoma BRAF^{V600E}, ha habido un enfoque razonable para el uso de inhibidores de BRAF con inhibidores de MEK. La combinación ha dado lugar a altas tasas de respuesta (70%) y una rápida inducción de respuesta y control de síntomas, con una supervivencia libre de progresión de aproximadamente 12 meses[305–307]. Pero al mismo tiempo, la mayoría de los pacientes desarrollan una resistencia secundaria en un período de tiempo relativamente corto[301, 304, 308]. Se han descubierto algunos de los mecanismos por los que se desarrolla esta resistencia secundaria y los investigadores han estado trabajando para desarrollar nuevos fármacos y nuevas combinaciones de fármacos para intentar conseguir un efecto más duradero (Figura 14) [301].

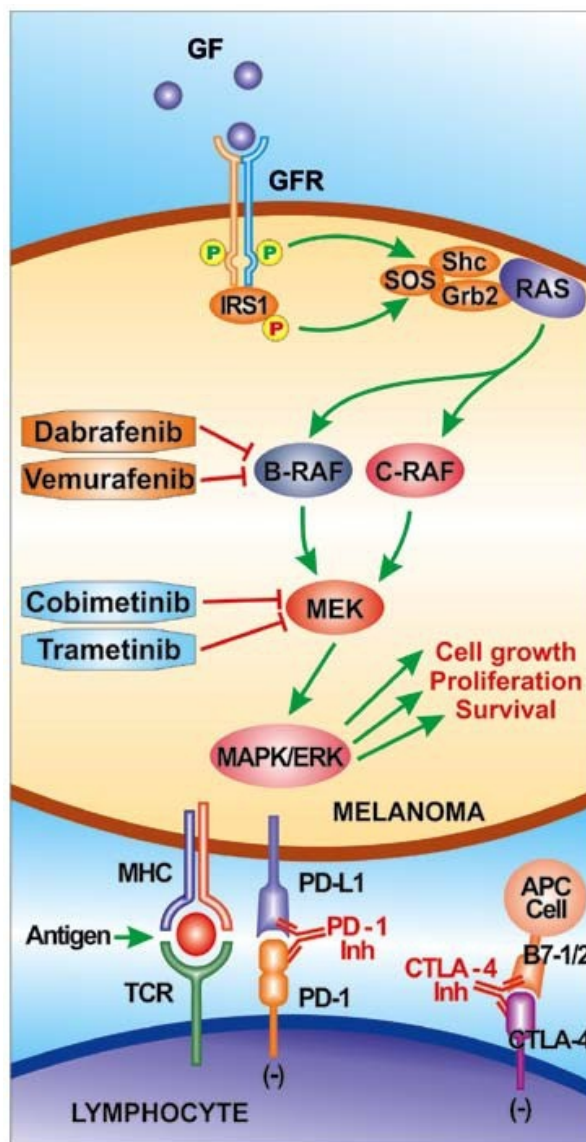


Figura 14. Tratamiento médico del melanoma. Los enfoques terapéuticos para el tratamiento del melanoma se basan en inhibidores de la proteína quinasa de serina / treonina y los nuevos inhibidores de puntos de control inmunológico. Dabrafenib y vemurafenib son inhibidores selectivos de B-RAF; cobimetinib y trametinib son inhibidores selectivos de MEK; ipilimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1k anti-CTLA-4, mientras que nivolumab y pembrolizumab son anticuerpos monoclonales IgG4 e IgG4k anti-PD-1, respectivamente. Todos estos anticuerpos monoclonales mejoran la eficacia del sistema inmunológico que es capaz de reconocer y erradicar las células tumorales. GF, factor de crecimiento; GFR, receptor del factor de crecimiento; IRS1, sustrato 1 del receptor de insulina; SOS, hijo de siete sin siete; Shc, proteína adaptadora SHC; Grb2, crecimiento proteína 2 unida al receptor del factor; RAS: protooncogén GTPasa de RAS; BRAF, protooncogén B-Raf; C-RAF: protooncogén RAF-1; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; ERK, proteína quinasa 1 activada por mitógenos; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; TCR, receptor de células T; PD-1, proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1, ligando 1 de muerte programada; APC, célula presentadora de antígeno; B7-1 / 2, CD80 / CD86; CTLA-4, antígeno de linfocitos T citotóxicos 4. (Leonardi et al. Int J Oncol 2018;52: 1071-1080.)

1.5.4. Inmunoterapia

Los tratamientos más eficaces para el melanoma metastásico hasta la fecha son los inhibidores de puntos de control inmunitarios, el primero de los cuales fue aprobado para uso clínico en 2011. El bloqueo de los puntos de control inmunitarios en el melanoma o en otros tumores sólidos se realiza mediante el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra PD1, PD-L1 / 2 y CTLA- 4 (Figura 15)[309–311]. La proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es un punto de control inmunológico que actúa de manera comparable a PD-1. CTLA-4 se expresa constitutivamente en las células T-reg y reconoce el receptor B7-1 / 2 en las APC[312, 313]. CTLA-4 compete con CD28 en células T por unirse a B7-1 / 2; cuando CD28 se une a B7-1 / 2, se activa una respuesta inmune mientras que la unión de CTLA-4 reprime la respuesta inmune[312, 314]. El tratamiento con anticuerpos contra PD-1, PD-L1 / 2 y CTLA-4 bloquea eficazmente la unión a los ligandos respectivos y la señal correspondiente que causa tolerancia, lo que permite la estimulación de una respuesta inmune[312, 315].

Hay tres fármacos inhibidores del punto de control inmunológico que han sido aprobados para su uso en el tratamiento del melanoma: el anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab y dos anticuerpos anti-PD-1 nivolumab y pembrolizumab. También hay varios fármacos de anticuerpos PD-L1 / 2 actualmente en ensayos clínicos, y algunos que han sido aprobados para uso clínico, aunque no para el melanoma[315].

El tratamiento con ipilimumab mostró una supervivencia duradera de hasta 10 años en el 20% de los casos; en comparación con la tasa de supervivencia media de menos de un año en pacientes con melanoma en estadio IV, esto supone un gran avance[314–316]. El pembrolizumab tiene una tasa de respuesta de aproximadamente 37 a 38% en pacientes con melanoma metastásico y una supervivencia general de 74% a los 12 meses[316]. El tratamiento con nivolumab mostró una tasa de respuesta de ~ 40% con una tasa de supervivencia general a los 12 meses del 73% en comparación con el 43% de los pacientes tratados con dacarbazina[317]. El tratamiento con ipilimumab combinado con nivolumab ha dado como resultado una tasa de respuesta de ~ 57% y 11,5 meses de supervivencia libre de progresión[318].

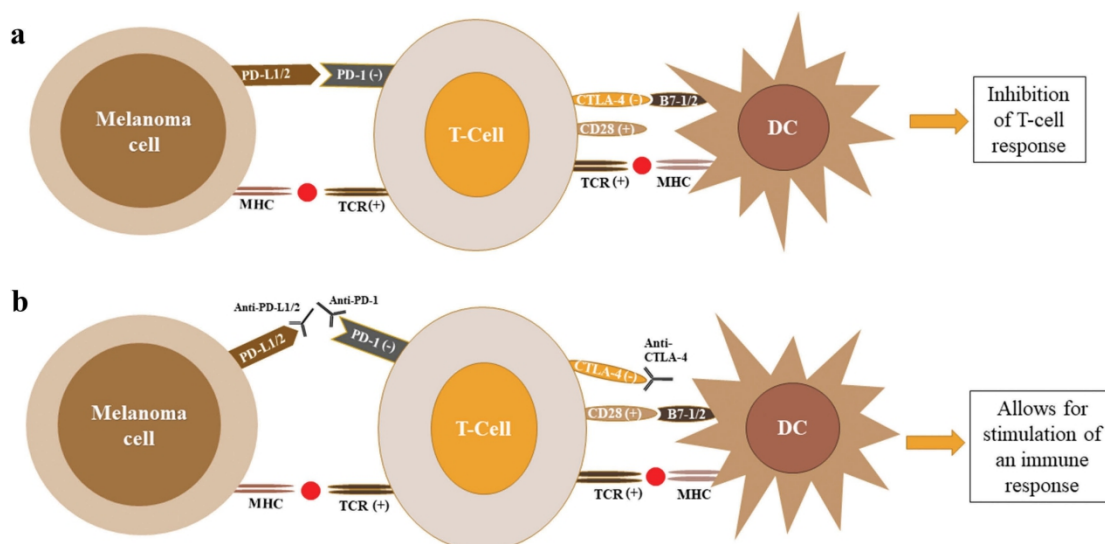


Figura 15. Regulación de la respuesta de las células T por CTLA4 y PD1. (A) La activación de las células T por las células dendríticas requiere la señalización de los complejos MHC y CD28. La unión de CTLA4 a B7-1 / 2 (CD80 / 86) suprime la activación de las células T y actúa como un mecanismo de retroalimentación para prevenir la respuesta inmune en curso. La unión al complejo MHC de clase I en las células del melanoma conduce a la activación de las células T. Después de la activación persistente, las células T regulan positivamente la expresión de PD-1. Cuando PD-1 se une a PD-L1 / 2 expresado por las células tumorales, esto conduce a la desactivación de las células T. (B) Los anticuerpos contra CTLA4, PD1 o PD-L1 / 2 evitan la unión a ligandos asociados que conducen a la activación de las células T y la estimulación de una respuesta inmune frente a las células tumorales. Abreviaturas: DC, célula dendrítica; CTLA4, antígeno 4 de linfocito T citotóxico; PD1, muerte programada 1; TCR, receptor de células T; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; PD-L1, ligando 1 de muerte programada; PD-L2, ligando de muerte programada 2. (Davis et al. Cancer Biol Ther 2019;20: 1366-1379).

1.5.4.1. Citocinas y quimiocinas como biomarcadores para el tratamiento con inhibidores de punto de control en melanoma

Los nuevos fármacos inhibidores de los puntos de control inmunológico necesitan biomarcadores y predictores más precisos para la respuesta al tratamiento y la detección de eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario. Actualmente se están investigando mediadores relacionados con la inmunidad como factores que promueven o bloquean la respuesta a la inmunoterapia contra el cáncer y pueden proporcionar información sobre la respuesta inmunitaria subyacente al tumor [319]. Las citocinas y quimiocinas son cruciales para facilitar el reclutamiento y la activación de subconjuntos específicos de leucocitos dentro del microambiente de los cánceres de piel [320]. Los mecanismos exactos de cómo operan estos mediadores, tanto inmunológicos como no inmunológicos, en el microambiente tumoral es un área de investigación activa y sus niveles pueden ser biomarcadores fiables de las respuestas a la inmunoterapia del cáncer [321].

El factor de crecimiento de células T prototípico, la IL-2 y la principal citocina antiinflamatoria, la IL-10, han tenido sorprendentemente poca correlación con las tasas de respuesta clínica reales, posiblemente debido a la naturaleza transitoria de expresión local de estas citocinas[322, 323]. Las investigaciones disponibles, muchas de las cuales se centraron en pacientes tratados con inhibidores de CTLA-4 que fueron aprobados mucho antes, con sus principales hallazgos y resultados clínicos previstos se resumen en la Tabla 4

Tabla 4. Biomarcadores de quimiocinas y citocinas investigados para determinar los resultados del tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios.

Tratamiento	Categoría de biomarcador	Biomarcador	Resultado asociado	Resumen del estudio	Referencia
CTLA-4	Factor inmune soluble en sangre	IL-17, TGF- β & IL-10	Los niveles basales predicen toxicidad y recaída	33 pacientes; sangre y suero; línea de base y 6 semanas después del tratamiento	[324]
CTLA-4	Factor inmune soluble en sangre	IL-6	Niveles altos por encima de la media asociados con el fracaso del tratamiento	40 pacientes; sangre y suero extraídos al inicio del estudio y después de hasta 4 tratamientos	[325]
CTLA-4	Factor inmune soluble en sangre	CXCL11 & sMICA	Niveles basales altos asociados con una supervivencia general deficiente después del tratamiento	137 pacientes; sangre y suero; validado de forma independiente en diferentes cohortes; niveles de línea de base	[326]
CTLA-4	Factor inmune soluble en sangre	IL-8	Disminuciones de los niveles séricos en los respondedores frente a niveles aumentados en los no respondedores	8 pacientes; sangre y suero; misma respuesta correlacionada con las respuestas al tratamiento con inhibidores de BRAF	[327]
PD-1	Factor inmune soluble en sangre	IL-8	Los primeros cambios (disminución) estuvieron fuertemente asociados con la respuesta	29 pacientes; sangre y suero; validado de forma independiente en una cohorte de 12 pacientes con melanoma y 19 pacientes con NSLCL	[328]
PD-1	Factor inmune soluble en sangre	IFN- γ , IL-6 & IL-10	Se encontraron niveles basales más altos en pacientes con respuesta tumoral objetiva en comparación con aquellos con progresión.	37 paciente; sangre y suero; línea de base y día 43	[322]
PD-1	Factor inmune soluble en sangre	IL-9 & TGF- β	Aumento de la frecuencia de células T CD4 productoras de IL-9 y aumento de los niveles séricos de TGF- β antes del tratamiento en los respondedores	46 pacientes; 18 respondedores y 28 no respondedores; pre y post tratamiento (3 infusiones)	[329]

Table 4: continuado

Tratamiento	Categoría de biomarcador	Biomarcador	Resultado asociado	Resumen del estudio	Referencia
PD-1	Factor inmune soluble en sangre y expresión génica del tejido tumoral	IFN- γ , IL-18, CXCL11 & IL-6	Se observaron cambios séricos. Aumento de expresión génica del IFN- γ en biopsias tumorales antes del tratamiento asociado con respuesta	Muestras de sangre y suero tomadas antes y después de los tratamientos.	[330]
CTLA-4	expresión génica del tejido tumoral	IFN- γ , CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IDO1, GBP1 and class II MHC molecules	Niveles basales más altos de genes relacionados con la inmunidad predijeron la respuesta clínica	45 pacientes; biopsia de tumor; antes y después de los tratamientos.	[331]
CTLA-4	Secuenciación del exoma completo del tumor	IFNGR1, IFNGR2, JAK2, IRF1, IFIT1, IFIT2, MTAP, miR3, SOCA1 & PIAS4	Los tumores resistentes al tratamiento contienen defectos en la expresión de los genes de la vía IFN- γ	12 no respondedores y 4 respondedores; Muestras de tumores	[332]
CTLA-4 followed by PD-1	expresión génica del tejido tumoral	GZMA, GZMB, PRF1, HLA-DQA1, HLA.DRB1, IFNG, STAT1, CCL5, CXCL9,-10, -11, ICAM1-5 & VCAM-1	La firma inmune activa en las primeras muestras de tumores fue altamente predictiva de la respuesta	5 pacientes que respondieron y 6 que no respondieron después del tratamiento con PD-1; muestras de tumores	[333]
PD-1	Secuenciación del exoma completo del tumor	JAK1 & JAK2	Los tumores resistentes al tratamiento contienen defectos en la expresión de los genes de la vía IFN- γ	4 pacientes; inicialmente tuvo una respuesta objetiva a los tratamientos, pero pasó a tener progresión de la enfermedad	[334]

Tabla 4: continuado

Tratamiento	Categoría de biomarcador	Biomarcador	Resultado asociado	Resumen del estudio	Referencia
PD-1	expresión génica del tejido tumoral	IFNG, STAT1, CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IDO1, PRF1, GZMA, MHCII, HLA-DRA, CXCR6,	Firma relacionada con el sistema inmunitario mediante el uso de ARN de muestras tumorales iniciales que se correlacionan con el beneficio clínico	19 pacientes; biopsias de tumores antes del tratamiento; validado en 62 pacientes con melanoma	[335]

1.5.4.2. Citocinas en el tratamiento del melanoma

Las citocinas son los principales reguladores de la inmunidad innata y adaptativa que permiten que las células del sistema inmunológico se comuniquen en distancias cortas [336]. La terapia con citocinas para activar el sistema inmunológico de los pacientes con cáncer ha sido una modalidad de tratamiento importante y sigue siendo un factor clave para la investigación clínica actual del cáncer [337]. El interferón alfa (IFN- α) está aprobado para el tratamiento adyuvante de pacientes con melanoma de alto riesgo completamente resecaados y varias neoplasias malignas refractarias. La interleucina-2 en dosis alta (HDIL-2) está aprobada para el tratamiento del melanoma y el cáncer de células renales metastásico, pero ambos agentes se utilizan actualmente con menos frecuencia con el desarrollo de los nuevos agentes farmacológicos. El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN gamma (IFN- γ), IL-7, IL-12 e IL-21 se evaluaron en ensayos clínicos y siguen siendo parte de ciertos ensayos de investigación. Se han completado los ensayos con la tan esperada IL-15 y se han iniciado estudios de combinación con anticuerpos antitumorales o inhibidores de puntos de control [338-341]. Sin embargo, las citocinas en monoterapia no han cumplido la promesa de eficacia observada en los experimentos preclínicos. A menudo se asocian con toxicidades severas que limitan la dosis que son manejables con la dosificación adecuada y ahora se entiende mejor que inducen factores humorales inmunosupresores, células supresoras y puntos de control celulares, sin inducir de manera constante una respuesta específica del tumor. Para sortear estos impedimentos, las

citocinas se están investigando clínicamente con nuevos preparados de citocinas modificadas (superquinas), proteínas de fusión quiméricas de anticuerpos y citocinas (immunocinas), vacunas contra el cáncer, inhibidores de puntos de control y anticuerpos monoclonales dirigidos contra el cáncer para aumentar su citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o mantener la citotoxicidad celular [62, 342, 343].

1.5.4.3. Algunos ejemplos de citocinas en el tratamiento del melanoma

IFN- α

En múltiples estudios, hubo una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad en diez de 17 comparaciones y la supervivencia general en cuatro de 14 comparaciones. En un metanálisis de 7 ensayos aleatorizados, el IFN α produjo una mejor supervivencia estadísticamente significativa que los que incluían hidroxiurea o busulfán[344].

Un ensayo de fase II que contenía IFN α con el anticuerpo anti-CTLA-4, tremelimumab, en pacientes con melanoma avanzado arrojó una tasa de respuesta global (ORR) del 24% con remisiones duraderas y evidencia de regulación a la baja de los mecanismos inmunosupresores del huésped[345].

GM-CSF

El GM-CSF es producido por monocitos, células T, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células estromales, lo que estimula la supervivencia de la colonia hematopoyética que forma células de los linajes de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, megacariocitos y eritrocitos. También estimula la presentación de antígenos al sistema inmunológico mediante efectos directos sobre las CD y los macrófagos con la inducción de la expresión de las moléculas del MHC de clase II en estas células. En un estudio con ratones, la transfección de células de melanoma B16 con vectores retrovirales recombinantes que expresan casi todas las citocinas estimulantes conocidas, moléculas coestimuladoras o moléculas de adhesión, GM-CSF, mostró la

mayor eficacia [346].

El tratamiento del melanoma autólogo transfectado con GM-CSF se evaluó en varios ensayos y produjo una infiltración constante de los depósitos tumorales por CD activadas, linfocitos CD8 +, células B y, curiosamente, eosinófilos y células plasmáticas que causaron una destrucción tumoral apreciable, pero también produjeron cicatrices prominentes que contribuyeron a una baja tasa de respuesta clínica [346-348]. Se evaluó el GM-CSF como tratamiento adyuvante para el melanoma en estadio III / IV completamente resecaado, pero los datos de varios ensayos clínicos no demostraron una eficacia constante [349].

IL-12

La IL-12 es una citocina heterodimérica que es el primer miembro de la familia de citocinas IL-12, que también incluye a IL-23, IL-27 e IL-35[283]. LA IL-12 consta de subunidades p35 y p40, esta última compartida por IL-23 y se secreta principalmente a partir de APC en respuesta a patógenos. La tasa de respuesta para los pacientes con melanoma refractario tratados con linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL) transducidos con IL-12 fue considerable (63%), pero la duración de la respuesta fue corta y se observaron toxicidades significativas relacionadas con el tratamiento que llevaron al abandono de esta estrategia.

IL-21

IL-21 tiene un papel importante en la diferenciación de células B en células plasmáticas, en el desarrollo de células T auxiliares foliculares (Tfh), promueve el desarrollo de células Th17 y mejora la supervivencia, actividad antiviral y actividad antitumoral de las células T CD8 + [350, 351].

La actividad antitumoral de IL-21 se ha demostrado en varios estudios preclínicos que mostraron inhibición del crecimiento del melanoma B16 y del fibrosarcoma MCA205 y aumento de la supervivencia de ratones portadores de tumores [352].

IL-7

La IL-7 es otra citocina que presenta la cadena común γ (CD132) de la familia de la IL-2, producida por células epiteliales y del estroma no hematopoyético: células del estroma de la médula ósea, células epiteliales del timo MHC II +, células epiteliales del hígado e intestinales, queratinocitos, CD foliculares, células del músculo liso y a veces, por DC y macrófagos.

Se llevaron a cabo dos ensayos de escalada de dosis en fase I en el Instituto Nacional del Cáncer. El primero en humanos fue un ensayo de escalada de dosis que administró SC rhIL-7 junto con 2 péptidos de melanoma bien caracterizados, gp100 y MART-1, principalmente para pacientes con melanoma maligno. El tratamiento fue bien tolerado, pero no se observaron respuestas objetivas. En el ensayo más reciente, los pacientes con neoplasias malignas no hematológicas incurables fueron tratados con dosis crecientes de SC rhIL-7 (3 a 60 mcg / kg) administradas en días alternos durante 2 semanas sin evidencia de actividad clínica[353, 354].

1.5.5. Vacunas

Con un conocimiento cada vez mayor del papel del sistema inmunológico en el desarrollo y la progresión del melanoma, se están investigando activamente las vacunas contra el melanoma. Se han utilizado varias estrategias para establecer una vacuna eficaz para el melanoma, que se incluyen en las siguientes cuatro categorías principales dependiendo de su contenido: células de melanoma, células dendríticas cargadas con Ags de melanoma, péptidos antigénicos de melanoma y las vacunas basadas en vectores virales. Sin embargo, la mayoría se encuentra actualmente en la fase de prueba y aún no se han obtenido resultados prometedores. Los estudios más relevantes sobre el desarrollo de vacunas para el melanoma se resumen en la Tabla 5[355].

Vacunas con células de melanoma. Las vacunas con células de melanoma son una forma de inmunoterapia activa y específica que implica el uso de componentes de células de melanoma o células de melanoma de tumores recién resecados obtenidos durante la cirugía. Las células tumorales pueden tener su origen en el paciente, otro donante o varios donantes[356].

Una estrategia para la inducción de linfocitos antitumorales es el uso de vacunas. Sin embargo, la mayoría de las vacunas probadas hasta la fecha se han basado en proteínas o células que son más eficaces como antígenos y estimulan la producción de células CD4 + en lugar de células CD8 +. La proteína de superficie de la célula T 4-1BB es un miembro de la familia TNFR y se ha probado su eficacia en el desarrollo de vacunas. En particular, se transfectó una línea celular de melanoma (M20) con HLA-A2 (A2) y luego con un plásmido que codifica 4-1BBL (BBL) y se utilizó para el desarrollo de una vacuna. Se demostró que esta vacuna M20 / A2 / BBL aumenta la producción de IFN- γ entre 4 y 6 veces la de una M20 transfectada con A2 (M20 / A2), lo que indica que la proteína BBL es un potente activador de la respuesta inmune a través de los linfocitos CD8[357].

Tabla 5. Resumen de diferentes tipos de vacuna para el melanoma

Tipo de vacuna	Numero de pacientes	Tratamiento /droga	Celulas utilizadas	línea celular murina	antígeno	Via de administración	Tipo de tumor
Vacunas con células de melanoma	34	4-1BBL	-	-	-	Parte superior del brazo o muslo	Melanoma en estadio IIIB / IV
Vacunas con células de melanoma	N/A	Micelas híbridas poliméricas	-	-	Péptido Trp2 Agonista de TLR-9	SC	Melanoma metastásico de pulmón
Vacunas con células de melanoma	N/A	HSP65-Her-2	-	-	-	Almohadillas traseras derechas	Melanoma metastásico de pulmón
Vacunas basadas en células dendríticas	N/A	Biomatrices	BMDCs	-	-	SC	Tumor secundario posquirúrgico de melanoma
Vacunas basadas en células dendríticas	-	BMDCs	BMDCs	C57BL/6	Péptido de listeriolisina O	SC	Melanoma peritoneal
Vacunas basadas en células dendríticas	-	BMDCs	BMDCs	C57BL/6	Péptido de listeriolisina O	PC	Melanoma metastásico de hígado y pulmón
Vacunas peptídicas	15	Péptido IDO	—	—	Péptido IDO	SC	NSCLC en estadio III / IV
Vacunas peptídicas	40	6MHP	-	-	gp100/tyrosinase (14aa)/tyrosinase (20aa)/melan-A/ MART-1/MAGE-A3/ MAGE-A1, 2,3,6	-	Melanoma en estadio IV
Vacunas peptídicas	35	6MHP	-	-	gp100/tyrosinase (14aa)/tyrosinase (20aa)/ Melan-A/MART-1/ MAGE-A3/MAGE- A1, 2,3,7	-	Melanoma en estadio IIIB/ IV
Vacunas peptídicas	66	RecPRAME +AS15	-	-	-	IM(deltoides o muslo)	Melanoma en estadio IV M1b-c

tabla 5: continuado

Tipo de vacuna	Numero de pacientes	Tratamiento /droga	Celulas utilizadas	línea celular murina	antígeno	Via de administración	Tipo de tumor
Vacunas peptídicas	-	TriVax/OX40 agonist	-	-	OVA/2W1S/VV H3L/ Trp1(14aa)/Trp1(8aa)/hgp100	IV/IP	melanoma
Vacunas basadas en vectores.	-	virus vaccinia+DA I	-	-	-	-	Cáncer de pulmón humano / melanoma humano / melanoma de ratón
Vacunas basadas en vectores.	-	adenovirus oncolítico	-	-	MART-1	In situ/IM	Melanoma
Vacunas basadas en vectores.	--	MS-OVA/ LM-OVA	-	-	-	SC	Melanoma

6MHP: 6 péptidos auxiliares de melanoma; BMDC: células dendríticas derivadas de la médula ósea; CT: quimioterapia; DA: reguladores de IFN; DTIC: dacarbazina; HM: micelas híbridas; IM: intramuscular; IP: intraperitoneal; IM: inmunoterapia; temozolomida subcutánea (Rodríguez et al. Mediators Inflamm 2017;2017: 3264217)

Vacunas basadas en células dendríticas. Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos potentes y eficaces y tienen una alta capacidad para inducir la inmunidad de las células T mediante la estimulación de la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias y la estimulación de las respuestas de las células T citotóxicas. Sin embargo, las vacunas basadas en células dendríticas aún no son completamente efectivas ya que los tumores tienden a residir en microambientes inmunosupresores que reducen su efectividad. Verma et al. utilizaron células dendríticas como vacunas para aumentar la resistencia del huésped en pacientes con melanoma. Las células dendríticas se incluyeron en una matriz de fibrinógeno y trombina (beDC) y mostraron una producción elevada de IFN- γ cuando se activaron por antígenos y citocinas asociados a tumores (Figura 16)[361].

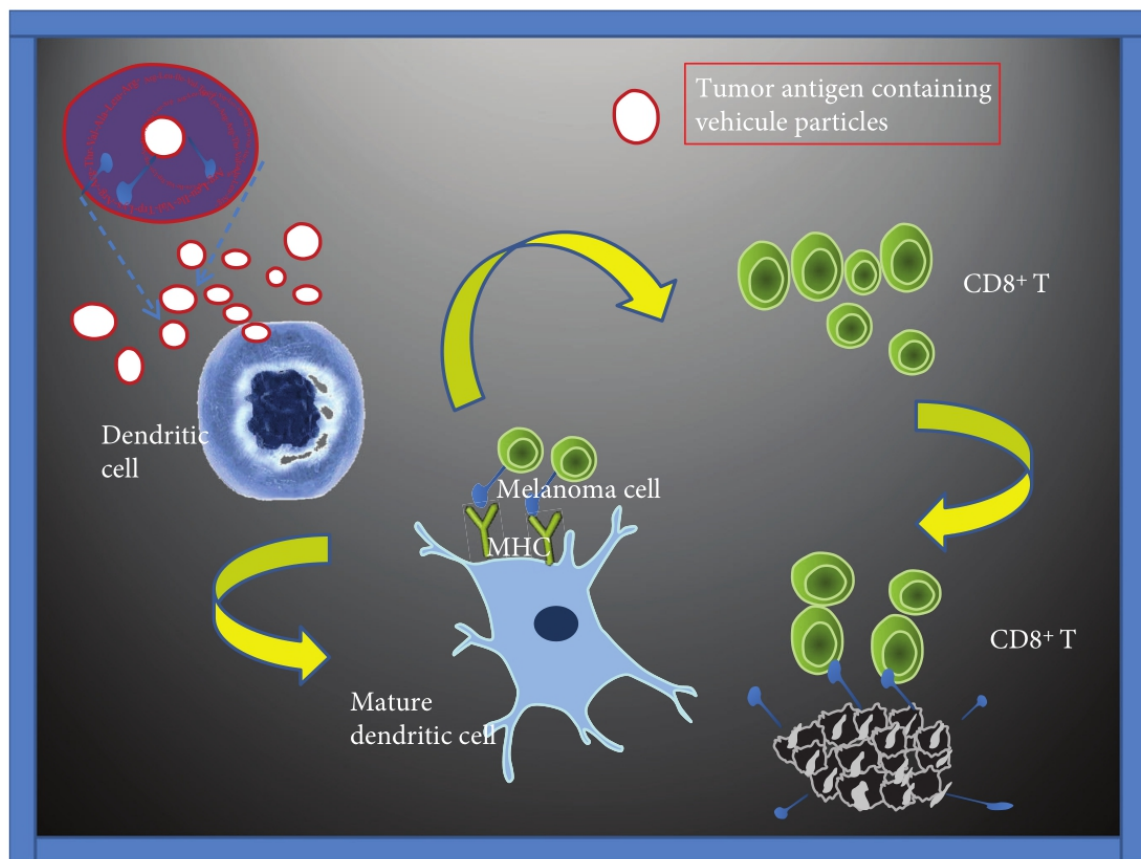


Figura 16. Diferentes vehículos podrían unirse a antígenos tumorales y adyuvantes dando como resultado la presentación de antígenos a las células dendríticas (DC). Una vez que estos vehículos se absorben, tanto el antígeno como el adyuvante se liberarán y degradarán, lo que conducirá a la aceleración de la maduración de las CD y de las moléculas de MHC ubicadas en la superficie celular que presentan el antígeno. Esto permitirá la unión a las células T CD8 + que se activan, proliferan y generan una respuesta antitumoral. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T (Rodríguez et al. *Mediators Inflamm* 2017;2017: 3264217).

Vacunas peptídicas. Dos estudios publicados en *Nature* por Sahin et al. (2017) y Ott et al.

(2017) proporcionan evidencia de que las vacunas contra neoantígenos tumorales (péptidos inmunogénicos) resultantes de mutaciones somáticas pueden ser inmunológica y terapéuticamente efectivas. En ambos estudios, los tumores de cada paciente se sometieron a secuenciación del exoma completo y del transcriptoma, seguida de la predicción del neoantígeno peptídico específico por los antígenos leucocitarios humanos (HLA) del paciente a los que se une con mayor afinidad. En Ott et al. (2017), 6 pacientes con melanoma en estadio III-IV resecado recibieron una vacuna personalizada con hasta 20 neoantígenos de péptidos largos por paciente utilizando adyuvantes para el receptor tipo toll 3 [TLR3] y la proteína 5 [MDA-5]. En Sahin et al. (2017), se utilizó una vacuna personalizada basada en ARN para tratar a 13 pacientes con melanoma en estadio III-IV. Aunque Ott et al. (2017) prioriza la predicción de péptidos presentados por las moléculas HLA de clase I y Sahin et al. (2017) prioriza la predicción de HLA de clase II, ambos usan vacunas de péptidos largos dejando al procesamiento de péptidos de la célula y a la maquinaria de presentación de antígenos la capacidad de definir en última instancia qué porción del péptido se presenta para el reconocimiento del receptor de células T (TCR)[370-372].

Los estudios de Ott et al. (2017) y Sahin et al. (2017) son independientes y difieren en su enfoque, pero llegan a conclusiones similares que ciertamente exigen una mayor exploración y expansión. En primer lugar, ambos demuestran que las vacunas de neoantígenos pueden sintetizarse con éxito y administrarse de forma segura a pacientes con melanoma. En segundo lugar, muestran que estas vacunas, ya sean basadas en péptidos o ARN, inducen respuestas de células T CD4 + y CD8 + polifuncionales, específicas de los neoantígenos. En tercer lugar, la vacunación puede provocar respuestas específicas frente a los neoantígenos a partir de células T vírgenes además de aumentar la inmunidad preexistente. En cuarto lugar, y de manera crucial, estos trabajos proporcionan evidencia clínica preliminar de que la vacunación personalizada con neoantígenos puede dirigir la inmunidad terapéutica antitumoral de forma específica. A medida que las mejoras tecnológicas aceleran el ritmo con el que se pueden sintetizar las vacunas de neoantígenos[371], los estudios de fase posterior pueden demostrar la eficacia en el melanoma y más allá, con una mejora potencial mediante la administración del bloqueo de puntos de control inmunológico[370, 372].

Adicionalmente, Iversen realizó un estudio preliminar de fase II de un tratamiento combinado

con una vacuna (IDO + péptidos de survivina, combinados con montanida, imiquimod y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) como adyuvantes) más el agente quimioterapéutico temozolomida (TMZ). De los 31 pacientes inscritos con melanoma en estadio IV, 15 fueron evaluados como positivos para la expresión de HLA-A2. Los datos clínicos preliminares de 7 pacientes mostraron que 2 tuvieron remisión parcial, 3 tuvieron enfermedad estable durante 3 meses o más y 2 mostraron progresión de la enfermedad con la aparición de nuevas lesiones[363].

Además, Hu et al. [295] vacunaron a pacientes de melanoma en estadio IV con 6 péptidos de 14-23 aminoácidos de diferentes antígenos tumorales del melanoma : gp10044-59, tyrosinase56-70, tyrosinase386-406, Melan-A/MART-151-73, MAGE-A3281-295, and MAGE-A1, 2,3,6121-134. Esta vacuna se denomina (6MHP Melanoma Helper Peptides) porque es presentada por las moléculas del MHC de clase II a los linfocitos T CD4 cooperadores (Helper). Las tasas generales de supervivencia a 1 y 5 años fueron más altas en el 38% y el 41% de los pacientes vacunados, respectivamente, en comparación con los de los grupos de control emparejados. Además, el 65% de los pacientes vacunados desarrollaron una respuesta inmune específica a 6MHP en la sangre periférica, y sus tasas de supervivencia a 1 y 5 años fueron 28% y 24% más altas, respectivamente, que las de los pacientes que no mostraron respuesta inmune. Los resultados de este estudio fueron superiores a los de estudios anteriores que probaron otros tratamientos en pacientes con melanoma en estadio IV[295].

Vacunas basadas en vectores. Los virus tienen la capacidad de infectar células y pueden estimular una respuesta inmunitaria. Los virus vacunales (VV) se han utilizado ampliamente como vectores de terapia génica, actuando como agentes oncolíticos debido a su capacidad para activar el sistema inmunológico contra tumores mediante la producción de citocinas u otras moléculas inmunomoduladoras. [373].

2. Hipótesis

El melanoma requiere la producción de una serie de factores solubles, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento o angiogénicos para poder invadir la dermis y los vasos sanguíneos en la fase de diseminación metastásica. El microambiente tumoral donde puede existir un infiltrado inflamatorio, responde al melanoma también con la secreción de factores solubles. Los niveles aumentados de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y angiogénicos producidos por el melanoma y el microambiente tumoral pueden alcanzar el torrente circulatorio y alterar sus concentraciones normales. La mayoría de los trabajos publicados sobre los niveles de factores solubles en pacientes de melanoma analizan simultáneamente un reducido grupo de los mismos. Sería por tanto de interés estudiar un amplio panel de estos factores para establecer patrones que pudieran relacionarse con el grado de invasión local del melanoma y su progresión metastásica para poder definir nuevas dianas terapéuticas.

Además, en los últimos años, la cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero se ha vuelto cada vez más importante en el estudio del melanoma maligno como posibles biomarcadores. Sin embargo no existen estudios para identificar la interrelación de los factores solubles entre las muestras de suero y el producido por las células de melanoma in situ. Teniendo esto en cuenta, consideramos que comprender el conjunto de factores solubles producidos por el melanoma, el microambiente tumoral y la respuesta sistémica del paciente podría ser de gran ayuda para detectar y monitorizar la progresión de la enfermedad y conducir a tratamientos prometedores e individualizados dirigidos frente a las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que tengan mayor relevancia en el proceso metastásico.

3. *Objetivos.*

1: Estudio de los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de cultivos celulares de melanoma y en los sueros autólogos de los pacientes.

1. Analizar el patrón de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento producidos por el melanoma premetastásico y metastásico en el sobrenadante de los cultivos de líneas de melanoma.

2. Detectar que factores solubles de los encontrados en el sobrenadante de las líneas de melanoma aparecen en el suero autólogo de los pacientes de cuyos melanomas se han obtenido las líneas en cultivo.

2: Estudio de los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con melanoma maligno humano

1. Estudio comparativo entre los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con melanoma maligno humano primitivo, metastásico y casos control.

2. Correlacionar los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con melanoma maligno humano primitivo con el Índice de Breslow.

3. Análisis de la posible asociación de los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con el melanoma maligno humano metastásico y las mutaciones de BRAF.

4. Determinar si algún factor soluble de los analizados tiene valor predictivo en cuanto a la supervivencia de los pacientes de melanoma.

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes.

1. Pacientes de melanoma para el establecimiento de las líneas celulares y la obtención de suero autólogo.

En este estudio, incluimos 10 muestras de tumor de melanoma maligno resecaadas de pacientes diagnosticados y tratados entre 2013 y 2017 en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, España. La edad media de los pacientes fue de 56 años (rango 28-94) y eran predominantemente mujeres (70%; 7/10). La mediana del grosor de Breslow del tumor fue de 5,45 mm (rango 1,39 -13 mm) y el 60% (6/10) de las muestras fueron melanomas de nivel IV-V de Clark. Entre todos los pacientes, el subtipo más común fue el melanoma de extensión superficial (50%; 5/10), seguido del melanoma metastásico (40%; 4/10). Solo un paciente (10%; 1/10) tenía melanoma nodular.

Tabla 6 Pacientes y características clínicas.

Características de línea base	Pacientes con melanoma	Donantes sanos
Sujetos	10	60
Edad, media (rango)	56 (28-94)	55 (25-87)
Sexo		
Masculino	3	20
Femenina	7	40
Mediana del índice de Breslow (rango)	5.45 mm (rango 1,39 -13 mm)	
Tipo histológico		
melanoma de extensión superficial (MES)	5	
melanoma metastásico	4	
melanoma nodular (MN)	1	

Las muestras de melanoma para la obtención de las líneas se dividieron en dos grupos: el primer grupo (MEC1) estuvo compuesto por 6 pacientes con melanoma primitivo con espesor de Breslow > 0,75 mm y alto número de mitosis / mm² (promedio de 8 mitosis / mm² aproximadamente). El segundo grupo (MEC2) incluyó a 4 pacientes con melanomas metastásicos.

Todos los datos de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y los Comités de Ética Institucional aprobaron el proyecto. Los datos de los pacientes se anonimizaron y se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la recolección de sangre periférica y muestras de tumores de todos los participantes incluidos en el estudio.

2. Pacientes de melanoma de los que se obtuvo suero para el estudio.

Se obtuvieron muestras de suero de 72 pacientes diagnosticados con melanoma en estadio I-IV. Los estadios tumorales se definieron a partir de muestras de biopsia según los criterios del sistema de estadificación TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC 2018), a través del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, España. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: enfermedad cardíaca, enfermedad autoinmune y diabetes mellitus. Los sujetos de control incluyeron 30 donantes sanos emparejados por edad y sexo que se obtuvieron del banco de sangre de Granada. Todos los donantes sanos no tenían indicios de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico. Se recolectaron muestras de todos los sujetos desde 2013 hasta 2017. Se obtuvieron las muestras de los pacientes antes de la escisión primaria del melanoma o de las metástasis. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito antes de la recolección de la muestra. El protocolo del estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional del hospital y el comité de ética. Las características clínico-patológicas de los pacientes se resumen en la tabla. 7.

Tabla 7 Pacientes y características clínicas.

Características de línea base	Pacientes con melanoma	Donantes sanos
Sujetos	72	30
Edad, mediana (rango)	55 (24-88)	53 (27-85)
Sexo		
Masculino	35 (48.6%)	15 (50%)
Femenina	37 (51.4%)	15 (50%)
Estadio de melanoma, n (%)		
Estadio I	42(58.33%)	
Estadio II	11(15.28%)	
Estadio III	11 (15.28%)	
Estadio IV	8 (11.11%)	
Índice de Breslow		
Espesor ≤ 1 mm	37 (69.8%)	
1.01 mm-2 mm	8 (15.1%)	
2.01 mm-4mm	5 (9.7%)	
>4.01 mm	3 (5.4%)	
Supervivencia a 5 años		
vivo, n (%)	55 (76.4%)	
fallecido, n (%)	17 (23.6%)	

4.2. Muestras de suero

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (4-5 ml) de pacientes y donantes sanos utilizando procedimientos de flebotomía estandarizados. Los procedimientos y estándares operativos se mantuvieron durante toda la recolección de muestras. Se recogieron muestras de sangre en ausencia de anticoagulantes y se dejaron coagular durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se separaron por centrifugación, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C antes del análisis. La extracción sanguínea se realizó en quirófano justo antes de la extirpación del melanoma primario o de las metástasis.

4.3. Cultivos de células de melanoma

Se utilizaron explantes de melanoma maligno de pacientes pertenecientes a los grupos MEC1 y MEC2 para establecer cultivos primarios. Las muestras de tumores recientes se desagregaron mecánicamente en placas de Petri y se sembraron en frascos de cultivo estériles de 25 ml que contenían 5 ml de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina (2 mM), ampicilina (500 μg / ml), gentamicina (40 μg / ml) y 10% de suero fetal bovino (FBS). Los matraces de células de cultivo se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO_2 , hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas y se controló semanalmente para asegurar que estuviera libre de micoplasmas. Después de subcultivar 10 veces, los cultivos primarios se consideraron cultivos establecidos a corto plazo. En esta etapa del procedimiento, las muestras de sobrenadantes se transfirieron a tubos estériles y luego se congelaron a -80°C hasta el momento del ensayo.

4.4. Inmunoensayo multiplex

Se midieron las concentraciones de 45 factores solubles en sobrenadantes y muestras de suero utilizando el kit ProcartaPlex™ de inmunoensayo 45-plex de citocina / quimiocina / factor de crecimiento humano (eBioscience, Viena, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los 45 factores solubles analizados fueron factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eotaxina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), proteína oncogénica relacionada con el crecimiento- α (GRO- α), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interferón (IFN) - α , IFN- γ , interleucina (IL) -1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, proteína 10 inducible por IFN- γ (IP-10, CXCL10) , factor inhibidor de la leucemia (LIF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos tipo 1 β (MIP-1 β , CCL4), MIP-1 α , NGF- β , quimiocina (motivo CC) ligando 5 (CCL5 / RANTES), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento placentario 1 (PIGF-1), factor de células madre (SCF), factor 1 derivado de células estromales (SDF-1 α), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), TNF- β , factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y VEGF-D.

Para la determinación de la concentración de la muestra se utilizó una curva estándar que variaba de 1,2 a 20 000 pg / ml. Se prepararon series de dilución cuádruple para comenzar con 20 000 pg / ml como punto de partida. En resumen, las bolitas (beads) de anticuerpo premezcladas se lavaron y se resuspendieron con 25 μ l de muestra o 25 μ l de estándares. Posteriormente, se cargaron estándares, muestras y blancos en microplacas de 96 pocillos como duplicados. Después de la carga, los estándares y las muestras se incubaron con las bolitas durante 60 min a temperatura ambiente. Las bolitas se lavaron tres veces y se añadió una mezcla de anticuerpos de detección y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, tras la incubación, se volvieron a lavar tres veces las bolitas y se añadió el reactivo de detección durante 30 min a temperatura ambiente. Para leer la placa, las bolitas se lavaron tres veces y se resuspendieron en

tampón de lectura. Las mediciones se realizaron utilizando la tecnología Luminex™ 200 (Luminex™ Copr., Austin, TX, EE. UU.). Las calibraciones y validaciones se realizaron antes de las ejecuciones y mensualmente, respectivamente. Se calculó la intensidad de fluorescencia media a partir de duplicados de cada muestra para determinar el límite de detección.

4.5. Análisis estadístico

Estudio casos control : Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad de las distribuciones. Cuando los datos no mostraron una distribución normal, se realizaron análisis estadísticos no paramétricos. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las diferencias en los niveles medios de citocinas entre pacientes con mutantes BRAF y pacientes con BRAF de tipo ancho (WT). Se utilizaron la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn para determinar las diferencias entre donantes sanos, melanoma primario y melanoma metastásico. Se utilizó el coeficiente de correlación de rango de Spearman para evaluar la correlación entre el grosor de Breslow de 53 pacientes con tumores primarios y la concentración de citocinas séricas. La relación entre las concentraciones de citocinas y las tasas de supervivencia de cada citocina se estratificó en dos grupos según la concentración media. El tiempo de seguimiento se definió desde la fecha de extracción de sangre de la muestra analizada hasta la fecha de seguimiento final o fallecimiento a través de la historia clínica del hospital. Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$. Los datos se analizaron utilizando programas de software estadístico disponibles comercialmente (SPSS 22; SPSS, Inc., Chicago, IL; y GraphPad Prism 6.02; GraphPad Software, La Jolla, CA).

Estudio de los sobrenadantes de cultivo y sueros autólogos : Los resultados de las muestras de suero y sobrenadante se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad. Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar o mediana y rango intercuartílico para las variables paramétricas y no paramétricas, respectivamente. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes y la prueba U de Mann-Whitney, según la distribución de los datos. Diferencias

con $P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (***) se consideraron estadísticamente significativos. Los valores resultantes se analizaron estadísticamente y se trazaron utilizando el software estadístico SPSS versión 25.0 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, EE. UU.) Y Graph Pad Prism versión 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).



5. Resultados

5.1. Análisis de factores solubles en cultivos de líneas de melanoma

Para definir el perfil de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento producido por melanoma premetastásico y metastásico, medimos el nivel de concentración de 45 factores solubles en el sobrenadante de 6 líneas de melanoma premetastásico derivadas de pacientes con índice de Breslow > 0.75 mm y con alto número de mitosis / mm² (MEC1) y 4 líneas celulares de melanoma metastásico (MEC2). Entre los 45 factores solubles analizados, 18 estaban por debajo del mínimo límite de detección en la mayoría de las muestras, y fueron excluidos del análisis (IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN- α , TNF- β , EGF, PDGF-BB y VEGF-D). Las 27 proteínas restantes analizadas se detectaron con un patrón similar en el sobrenadante de ambos cultivos de líneas de melanoma. Este patrón incluye: 10 citocinas proinflamatorias (IL-2, IL-6, IL-4, IL-7, IL-8, IL-18, IL-31, IFN- γ , LIF y TNF α), 8 quimiocinas (Eotaxina, GRO- α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y SDF-1), 8 factores de crecimiento (BDNF, FGF-2, GM-CSF, HGF, NGF- β , PIGF-1, SCF y VEGF-A) y 1 citocina anti-inflamatoria (IL-1RA).

Cuantitativamente, las 27 proteínas comunes para ambos cultivos establecidos se dividieron en cuatro grupos arbitrarios según su concentración (Tabla 8): (I) Nivel A. Grupo de alta concentración (> 500 pg / ml) formado por VEGF-A, IL-6, MCP-1, IL-8 y SDF-1. (II) Nivel B. Concentración intermedia (500–90 pg / ml) compuesta por HGF, MIP-1 β , GRO- α y LIF. (III) Nivel C. Grupo de baja concentración (70-14 pg / ml), donde podemos encontrar IL-1RA, IL-4, IL-31, IL-2, TNF- α , FGF-2, MIP-1 α , PIGF-1, BDNF y NGF- β . Es importante resaltar que RANTES (25 pg / ml) en MEC1 se incluye en este tercer grupo, sin embargo, para MEC2, RANTES (4.5 pg / ml) pertenece al cuarto grupo. Finalmente, (IV) Nivel D. Concentración muy baja (<14 pg / ml), que comprende GM-CSF, IP-10, SCF, Eotaxina, IL-7, IL-18 e INF- γ .

Tabla 8. Concentración de factores solubles en sobrenadantes de cultivos establecidos de melanoma premetastásico (MEC1) y metastásico (MEC2)

	MEC1	MEC2	P
Nivel A	>500 pg/ml	>500 pg/ml	
	VEGF-A: 2846.3 ± 1460	VEGF-A: 5199 ± 138.9	0.014 ^a
	IL-6: 2404.6 ± 363.9	IL-6: 2736.1 ± 188.9	ns ^a
	MCP-1: 2413.8 (1768.6–2462.7)	MCP-1: 1836.2 ± 802.7	ns ^a
	IL-8: 1875.9 ± 1458.4	IL-8: 1355.7 ± 536.8	ns ^a
	SDF-1: 1114.1 ± 429.4	SDF-1: 670.8 ± 223.4	ns ^b
Nivel B	500–90 pg/ml	500–90 pg/ml	
	HGF: 375 ± 239.8	HGF: 91 ± 78.3	ns ^a
	MIP-1β: 349.1 ± 189.7	MIP-1β: 419.5 ± 226.1	ns ^a
	GRO-α: 344.3 ± 262.6	GRO-α: 250.5 ± 201.3	ns ^a
	LIF: 248.2 ± 131.1	LIF: 362.6 ± 142.6	ns ^a
Nivel C	90–14 pg/ml	90–14 pg/ml	
	IL-1RA: 59 ± 29.5	IL-1RA: 37.6 ± 13.4	ns ^a
	IL-4: 55.4 ± 10.5	IL-4: 45.2 ± 1.6	ns ^b
	IL-31: 51.4 ± 40.9	IL-31: 38.1 ± 24.3	ns ^a
	IL-2: 30.8 ± 5	IL-2: 33.3 ± 7.7	ns ^a
	TNF- α: 28.8 ± 8.1	TNF- α: 30 ± 2.4	ns ^a
	RANTES: 25.5 ± 29	RANTES: 4.5 ± 1.9 (Level D)	ns ^b
	FGF-2: 23.9 ± 6.4	FGF-2: 35.6 ± 3.9	0.010 ^a
	MIP-1α: 23.3 ± 13.7	MIP-1α: 47.6 ± 35	ns ^b
	PIGF-1: 18.1 ± 10.4	PIGF-1: 27.9 ± 25.9	ns ^a
	BDNF: 18.1 ± 14.1	BDNF: 67.3 ± 26	<0.001 ^a
	NGF-β: 14.5 ± 4.2	NGF-β: 22.2 ± 1.4	0.008 ^a
Nivel D	<14 pg/ml	<14 pg/ml	
	GM-CSF: 13.1 ± 6.5	GM-CSF: 13.6 ± 2.1	ns ^a
	SCF: 11.9 ± 8.6	SCF: 7.2 ± 2.7	ns ^b
	IP-10: 1.5 (1–29.6)	IP-10: 3.3 ± 1.5	ns ^b
	IL-18: 2.8 ± 0.3	IL-18: 2.8 ± 1.9	ns ^b
	Eotaxin: 2.6 (1.1–7.9)	Eotaxin: 1.7 ± 0.8	ns ^b
	IL7: 2.3 (1.7–6.1)	IL7: 1.6 ± 1	ns ^b
	INF-γ: 1.2 ± 0.3	INF-γ: 1.6 ± 0.9	ns ^b
	PIGF-1: 18.1 ± 10.4	PIGF-1: 27.9 ± 25.9	ns ^a
	BDNF: 18.1 ± 14.1	BDNF: 67.3 ± 26	<0.001 ^a
	NGF-β: 14.5 ± 4.2	NGF-β: 22.2 ± 1.4	0.008 ^a

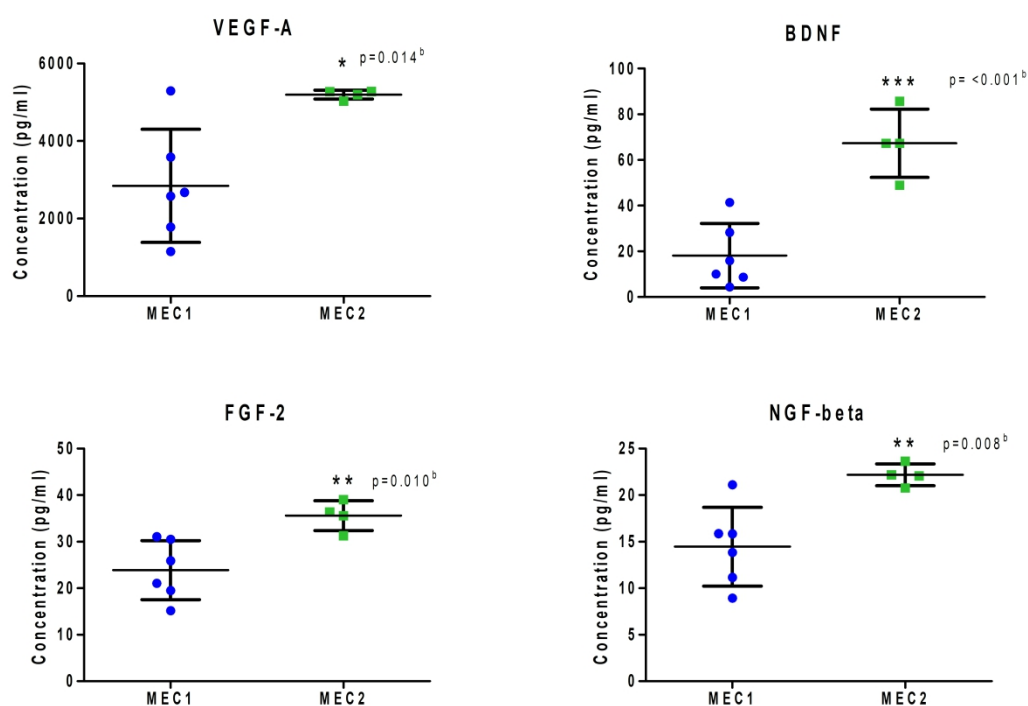
Estos factores se dividieron en cuatro grupos: (A) concentración alta, (B) concentración intermedia, (C) concentración baja y (D) concentración muy baja. Los datos se presentan como mediana con rango intercuartílico 25-75 (variables no paramétricas) o media ± desviación estándar (variables paramétricas). Todas las concentraciones se enumeran en pg / ml. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p <0,05.

^aIndependent students' samples t-test.

^bMann-Whitney U test.

*ns: no significativo ($P > 0.05$).

VEGF-A ($P = 0.014$), BDNF ($P < 0.001$), FGF-2 ($P = 0.010$) y NGF- β ($P = 0.008$) fueron significativamente más altos en MEC2 en comparación con MEC1 (Figura 17).



Fi

Figura 17. Análisis comparativo de factores solubles producidos por cultivos establecidos derivados de melanomas premetastásicos con más de 0,75 mm de índice de Breslow y alta tasa mitótica (MEC1) y melanomas metastásicos (MEC2). Los valores p se obtuvieron utilizando ^aMann-Whitney U test o ^bIndependent students' samples t-test.

5.2. Análisis de factores solubles en suero autólogo de pacientes con melanoma y controles sanos

Cuando se analizaron muestras de suero autólogo derivadas de pacientes premetastásicos (PM) (cuyos melanomas han dado origen a las líneas MEC1), pacientes con melanoma metastásico (MM) (a partir de cuyas metástasis se han establecido las líneas MEC2) y sueros de sujetos de control, se observó que aproximadamente la mitad de los factores solubles totales analizados (46,6%; 21/45) estaban por encima del límite de detección (Tabla 9). Cuando comparamos el perfil de producción entre muestras de suero autólogo (Tabla 9) y muestras de sobrenadante (Tabla 8), encontramos que la mayoría de los factores solubles (19/27) detectados en el sobrenadante también se detectaron en sueros autólogos de pacientes. Sin embargo, IL-2, IL-4, IL-8, IL-31, FGF-2 y GRO α no se encontraron en muestras de suero autólogo ni en controles sanos. PDGF -BB y EGF solo se encontraron en pacientes con melanoma autólogo y suero de sujetos de control, pero no en muestras de sobrenadantes de cultivo (Tabla 9). En suero autólogo de MM, no se detectaron GM-CSF y NGF- β , sin embargo, estos factores tenían una concentración muy baja en las muestras de suero de PM y control (datos no proporcionados).

Tabla 9. Análisis comparativo de factores solubles producidos en muestras de suero de melanoma metastásico (PM) y metastásico (MM) con muestras de suero de controles sanos (HC)

Factores solubles	HC	PM	P	MM	P
Perfil A					
PDGF-BB	217.1 (163.1–284.7)	513.5 ± 184.8	0.012 ^a	413.6 ± 61	<0.001 ^a
MIP-1 beta	117.3 (78.5–193.2)	247.8 (213.6–359.7)	0.001 ^b	271.8 (226.6–309.6)	0.003 ^b
HGF	287 ± 140.2	435.8 ± 166.7	0.017 ^a	342.2 ± 117.9	ns ^a
PIGF-1	1 (0.8–1)	17.2 (8.3–31.6)	<0.001 ^b	12.5 (2.9–13.5)	ns ^b
Perfil B					
BDNF	736.3 ± 201	147.5 (46.3–444.5)	<0.001 ^b	32.9 (15.1–346.3)	<0.001 ^b
EGF	72.1 (28.1–99.2)	68.5 ± 73.6	ns ^a	25.7 (10.9–32.5)	0.048 ^b
Eotaxin	72.3 ± 33.3	46.5 ± 38.5	ns ^a	19.2 ± 16.3	0.003 ^a
IP-10	17 (13.4–23.3)	14.9 (7.7–33.5)	ns ^b	10.4 (7.3–15.1)	0.016 ^b
Perfil C					
SDF1	594.8 (528.3–689.6)	515.7 ± 212.8	ns ^a	532 ± 71.6	ns ^a
VEGF-A	296.9 (159.1–386.4)	394 (277.2–632.8)	ns ^b	159 (75.3–476.9)	ns ^b
MCP-1	179.8 (122.6–271.9)	107.8 (79.2–268.6)	ns ^b	177.4 (83–216.3)	ns ^b
IL-1RA	149.4 (102.6–209.8)	103 (81.1–296.6)	ns ^b	109.3 (71.2–166.1)	ns ^b
IL-18	39 (27.6–52.9)	24.4 ± 20.4	ns ^a	27.6 (12.8–45.4)	ns ^b
RANTES	38.5 (35.8–45.1)	51.9 (36.6–73.7)	ns ^b	51.3 (29.7–68.2)	ns ^b
MIP-1 alpha	5.7 (3.2–10)	11.9 (6.9–16.8)	ns ^b	8.7 (6–11.3)	ns ^b
IL-7	6.3 (4.6–10.8)	9.7 (6.3–16.3)	ns ^b	4.6 (3.6–9.4)	ns ^b
LIF	1.6 (1.2–2.3)	4.2 (1.8–6.1)	ns ^b	4.2 (2–4.8)	ns ^b
IL-6	2.4 (2.4–2.4)	1.4 (0–3.5)	ns ^b	2.6 (0.6–3.4)	ns ^b
SCF	1.3 (1.3–1.3)	4 (0–6.9)	ns ^b	2.1 (1.2–3.2)	ns ^b
IFN-gamma	1.9 (1.2–4)	2.2 (1.2–3)	ns ^b	1.6 (1.2–4.1)	ns ^b
TNF-alpha	1.2 (0.7–1.2)	0.1(0–2.5)	ns ^b	0.5 (0–2.5)	ns ^b

El perfil A representa factores solubles, cuya concentración es estadísticamente superior en PM y MM en comparación con el suero de HC. El perfil B está formado por factores solubles, cuya concentración es significativamente menor en PM y MM en comparación con el suero control. El perfil C está compuesto por factores solubles sin diferencias estadísticas entre todos los grupos. Los datos se presentan como mediana con rango intercuartílico 25-75 (variables no paramétricas) o media ± desviación estándar (variables paramétricas). Todas las concentraciones se enumeran en pg / ml. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

^aIndependent students' samples t-test.

^bMann-Whitney U test.

*ns: no significativo ($P > 0.05$).

Cuando comparamos los resultados séricos de PM y MM y sujetos sanos (Figura 18), observamos que el PDGF-BB ($P = 0,012$ / $P < 0,001$) y MIP-1 beta ($P = 0,001$ / $P = 0,003$) aumentaron en pacientes con PM y MM. HGF ($P = 0.017$) y PIGIF-1 ($P < 0.001$) se incrementaron solo en PM. Por el contrario, el BDNF disminuyó en pacientes con PM y MM (ambos $P < 0,001$)

en comparación con el suero de control. Además, EGF ($P = 0.048$), Eotaxin ($P = 0.003$) e IP-10 ($P = 0.016$) solo disminuyeron en pacientes con MM. No hubo diferencias de la concentración para SDF-1, VEGF-A, MCP-1, IL-1RA, IL-18, RANTES, MIP-1 α , IL-7, LIF, IL-6, SCF, INF- γ y TNF- α . No se encontraron diferencias cuando se comparó el panel completo de 21 factores solubles solo entre pacientes con PM y MM (datos no proporcionados).

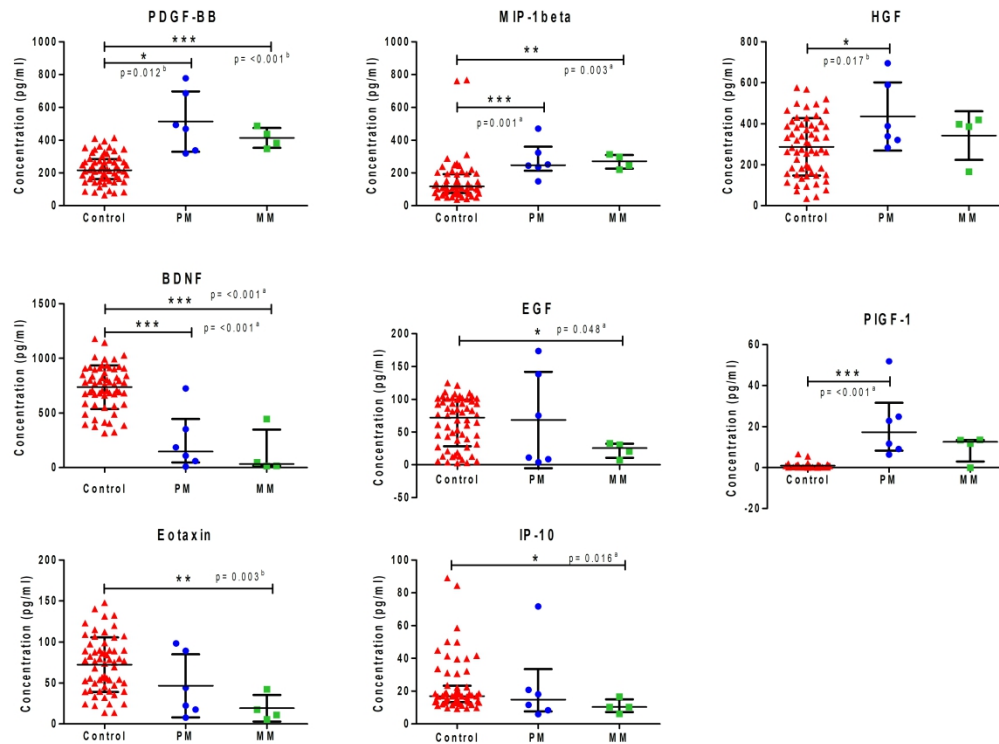


Figura 18. Análisis comparativo de factores solubles producidos por suero premetastático (PM) y melanoma metastático (MM) con muestras de suero de controles sanos. Los valores p se obtuvieron utilizando ^aMann-Whitney U test o ^bIndependent students' samples t-test.

5.3. Concentraciones de citocinas en pacientes con melanoma

Se obtuvieron muestras de suero de 72 pacientes con melanoma. La distribución de los estadios clínicos fue la siguiente: estadio I (n = 42); estadio II (n = 11); estadio III (n = 11); y estadio IV (n = 8). Para investigar la participación de citocinas y quimiocinas específicas durante el desarrollo del melanoma, se compararon los niveles séricos de cada factor soluble en pacientes de melanoma agrupados en melanoma primitivo (estadios I y II, n = 53) y melanoma metastásico (estadios III y IV, n = 19) entre sí y con los controles sanos (n = 30).

A partir de estos análisis, se observaron concentraciones más altas de VEGF-A, PDGF-BB, IL-1RA, PIGF-1, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α y SCF (Figura 19, Tabla 10) en pacientes con melanoma. Por el contrario, se observaron concentraciones más bajas de BDNF, SDF-1 α , MCP-1, Eotaxina, EGF e IL-7 en el suero de pacientes con melanoma en comparación con los controles sanos (Figura 19, Tabla 11). De las citocinas elevadas, VEGF-A y PDGF-BB mostraron diferencias significativas entre los tres grupos, con concentraciones más altas en el melanoma metastásico (estadio III y IV) en comparación con melanoma primario (estadio I y estadio II). Además, los niveles de IL-1RA, PIGF-1, IFN- γ y TNF- α se elevaron significativamente en pacientes con melanoma primario y melanoma metastásico en comparación con donantes sanos, pero no mostraron diferencias entre el melanoma primario y el melanoma metastásico. Los niveles de MIP-1 α y SCF fueron significativamente más altos en pacientes con melanoma primario en comparación con donantes sanos. Se observaron concentraciones reducidas de BDNF, SDF-1 α , MCP-1, eotaxina y EGF en pacientes con melanoma primario y melanoma metastásico en comparación con sujetos sanos. Sin embargo, los niveles de estos factores solubles no difirieron entre los pacientes con melanoma primario y con melanoma metastásico. Los niveles de IL-7 fueron significativamente más bajos en pacientes con melanoma metastásico en comparación con los controles sanos.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de LIF, IL-6, IP-10, HGF, MIP-1 β , IL-18, RANTES, IL-1 β , VEGF-D, GRO- α , IL-4, IL-5, IL-2, IL 12p70, IL-13, bNGF, IL-21 y FGF-2. Los niveles de IL-8, IL-10, IL-17A, IL-27, IL-31, GM-CSF, IFN- α , IL-9, VEGF-D, TNF- β ,

NGF β , IL -23, IL-22 e IL-1 α estaban por debajo del umbral de detección tanto en pacientes con melanoma como en controles sanos.

Tabla 10. Niveles elevados de factores solubles en pacientes con melanoma frente a controles sanos

citocina	Mediana (rango), pg/ml	Significado
VEGF-A		
Donante sanos	290.44 (31.1~1022.19)	P ³ =0.029
Melanoma primario	487.93 (48.51~1290.95)	P ¹ =0.016
Melanoma de metástasis	713.74 (162.5~1474.77)	P ² =0.001
PDGF-BB		
Donante sanos	218.10 (77.95~401.93)	P ³ =0.021
Melanoma primario	360.45 (71.02~990.06)	P ¹ =0.001
Melanoma de metástasis	468.29 (204.61~986.70)	P ² =0.001
IL-1RA		
Donante sanos	151.24 (26.39~552.77)	
Melanoma primario	350.753 (26.77~1240.28)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	381.37 (67.86~1049.55)	P ² <0.001
PIGF-1		
Donante sanos	4.56 (0.06~16.02)	
Melanoma primario	17.64 (1.94~76.96)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	13.48 (0.91~38.53)	P ² <0.001
IFN-γ		
Donante sanos	1.80 (0.61~6.86)	
Melanoma primario	7.32 (0.65~25.86)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	7.43 (1.13~32.85)	P ² <0.001
TNF-α		
Donante sanos	0.97 (0.41~2.9)	
Melanoma primario	2.37 (0.23~7.53)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	2.45 (0.46~7.93)	P ² <0.001
MIP-1α		
Donante sanos	5.877 (0.19~20.11)	
Melanoma primario	10.37 (0.59~39.91)	P ¹ =0.014
Melanoma de metástasis	9.90 (2.72~24.59)	
SCF		
Donante sanos	4.00 (0.67~8.23)	
Melanoma primario	6.95 (0.77~43.51)	P ¹ =0.007
Melanoma de metástasis	4.70 (0.68~12.59)	

Nota: Las muestras de suero se analizaron mediante ensayos de citocinas multiplexadas de 45 plex. Los biomarcadores séricos que muestran diferencias entre pacientes con melanoma y grupos de control sanos se presentan como mediana (rango) (pg / ml).

p¹: diferencias significativas entre donantes sanos y pacientes con melanoma primario.

p²: diferencias significativas entre donantes sanos y pacientes con melanoma metastásico.

p³: diferencias significativas entre pacientes con melanoma primario y melanoma metastásico.

Tabla 11. Factores solubles que muestran niveles reducidos en pacientes con melanoma frente a controles sanos.

citocina	Mediana (rango), pg/ml	Significado
BDNF		
Donante sanos	769.86 (320.02~1161.64)	
Melanoma primario	332.13 (4.70~943.70)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	230.67 (14.62~774.21)	P ² <0.001
SDF-1α		
Donante sanos	600.59 (398.09~857.74)	
Melanoma primario	384.47 (197.16~825.62)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	423.54 (205.60~601.79)	P ² <0.001
MCP-1		
Donante sanos	183.05 (54.91~358.44)	
Melanoma primario	102.12 (21.67~315.81)	P ¹ <0.001
Melanoma de metástasis	128.53 (26.65~228.36)	P ² =0.022
Eotaxin		
Donante sanos	76.733 (13.76~144.17)	
Melanoma primario	43.98 (5.8~114.72)	P ¹ =0.008
Melanoma de metástasis	39.98 (5.62~124.05)	P ² =0.003
EGF		
Donante sanos	72.34 (2.91~123.27)	
Melanoma primario	26.86 (3.49~136.14)	P ¹ =0.011
Melanoma de metástasis	16.24 (2~89.45)	P ² =0.001
IL-7		
Donante sanos	6.29 (1.83~15.64)	
Melanoma primario	4.80 (0.58~17.84)	
Melanoma de metástasis	3.35 (0.29~10.95)	P ² =0.012

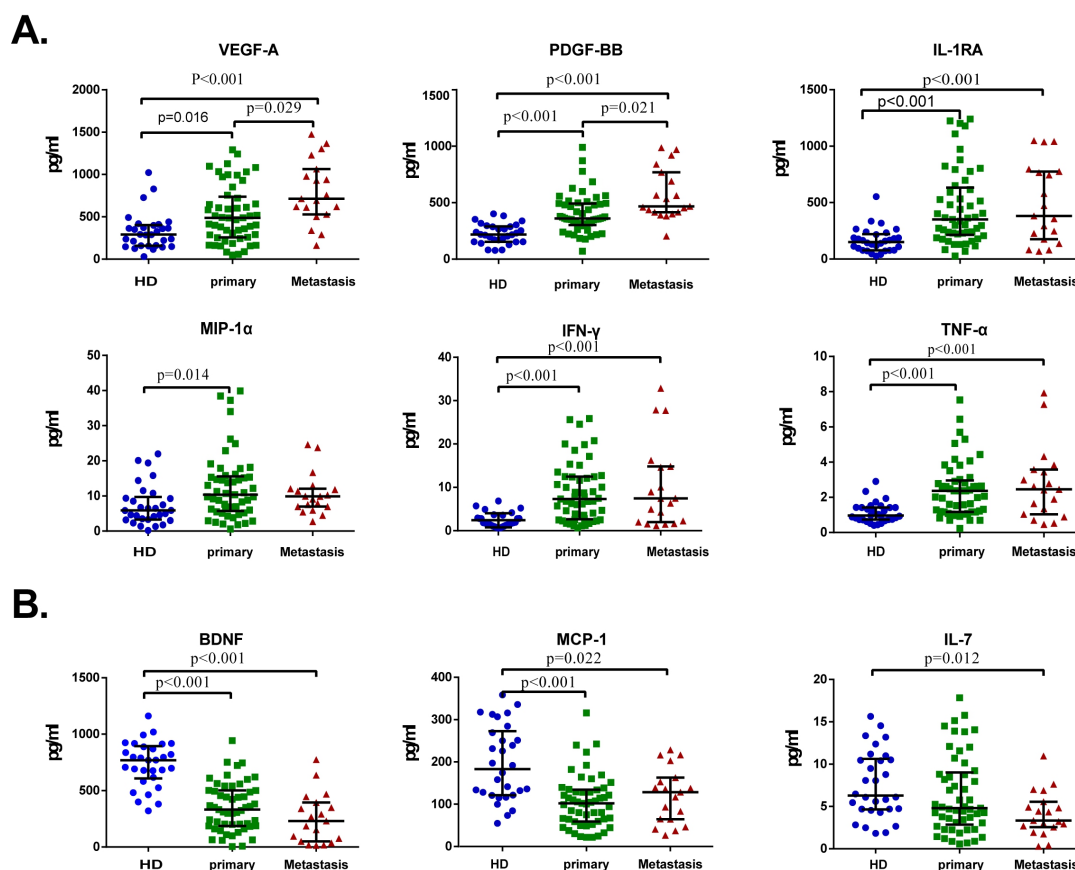


Figura 19 Análisis de los niveles de citocinas en las muestras de suero de pacientes con melanoma y controles sanos. Se recogió suero de 53 pacientes con melanoma primario y 19 pacientes con melanoma metastásico y se comparó con el suero de 30 donantes sanos. Las mediciones se realizaron utilizando el sistema de inmunoensayo de 45 plex. (A) citocinas que muestran concentraciones más altas en pacientes con melanoma en comparación con donantes sanos. (B) citocinas que muestran concentraciones más bajas en pacientes con melanoma en comparación con donantes sanos. Las líneas horizontales indican la mediana de cada grupo.

5.4. Concentraciones de citocinas e índice de Breslow

El índice de Breslow es el predictor más fuerte de la supervivencia del paciente y se puede utilizar para definir la profundidad de la invasión tumoral desde el estrato granular hasta las células de melanoma de penetración más profunda. Al utilizar el sistema de estadificación del melanoma AJCC para el melanoma primario, los tumores ≤ 1.0 mm se designan como de bajo riesgo con tasas de supervivencia a 10 años del 92%; los tumores de 1.01 a 2.0 mm muestran tasas de supervivencia a 10 años del 80%; los tumores que miden 2.01-4.0 mm muestran tasas de supervivencia a 10 años del 63%; y los tumores ≥ 4 mm muestran tasas de supervivencia a 10 años del 50% [374, 375]. Identificamos 3 citocinas que se correlacionaron positivamente con el aumento de índice de Breslow: TNF- α ($p = 0.320$, $r = 0.019$), IFN- γ ($p = 0.311$, $r = 0.023$), VEGF-A ($p = 0.014$, $r = 0.337$). A diferencia de BDNF (0,004, $r = -0,391$) que se correlacionó

negativamente con el grosor de Breslow (Figura 20).

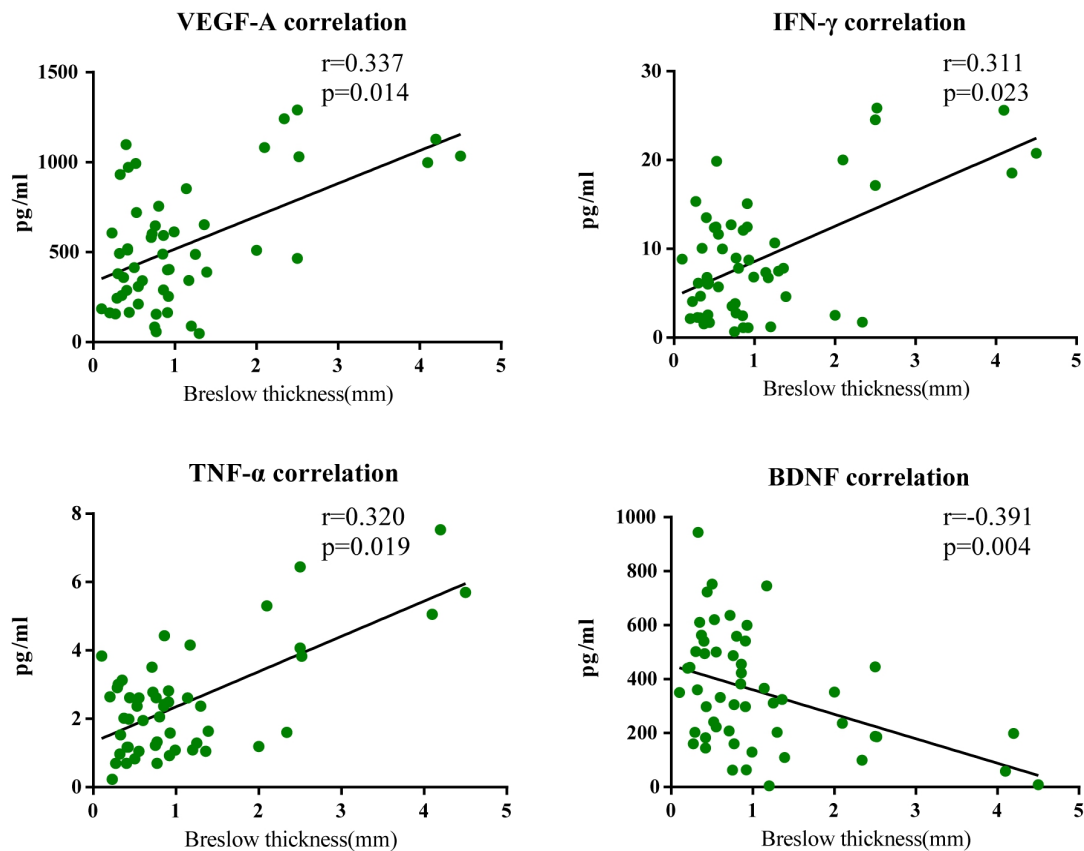


Figura 20. Concentraciones de citocinas y índice de Breslow. Correlación entre la concentración (pg / ml) de factores solubles en pacientes con melanoma primario (n = 53) y el índice de Breslow (mm). Los coeficientes de correlación de Spearman (r) muestran la fuerza de la correlación. $p < 0.05$ se consideró significativo.

5.5. Niveles de citocinas y BRAF

A continuación, investigamos la relación entre los niveles de citocinas y el desarrollo de melanoma metastásico (estadios III y IV). Las mutaciones de *BRAF* son las más frecuentes en pacientes con melanoma, y se recomienda su identificación para pacientes con melanoma avanzado para permitir la selección del régimen de tratamiento óptimo [376]. La cohorte del estudio consistió en 19 pacientes con melanoma avanzado (11 con estadio III y 8 con estadio IV), la mutaciones de *BRAF* se analizaron en 15 pacientes de los cuales 5 pacientes tenían *BRAF* mutado y en 10 pacientes no presentaban mutaciones para *BRAF* (Wild Type). La concentración de citocinas se comparó entre pacientes con mutaciones en *BRAF* y pacientes con *BRAF* normal

utilizando una prueba de Mann-Whitney, ya que los datos mostraron una distribución que no era normal. A partir de estos análisis, solo IL-7 ($p = 0,019$, Figura 21, tabla 12) tuvo niveles significativamente más bajos en pacientes con mutaciones de *BRAF* frente a pacientes con *BRAF* normal.

Tabla 12. Niveles de citocinas y estado de BRAF

citocina	Mediana (rango), pg/ml	Significado
IL-7		
BRAF mutant	2.68 (0.29~3.22)	P=0.019
BRAF wide type	6.22 (0.68~17.85)	

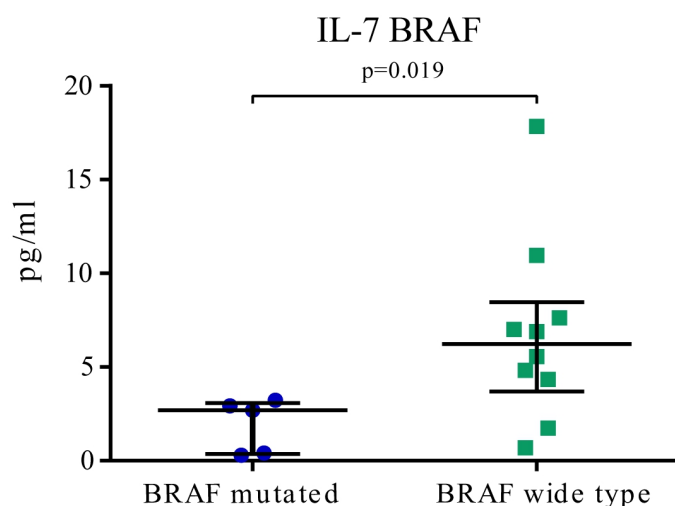


Figura 21. Análisis de citocinas en las muestras de suero de pacientes con melanoma con mutaciones BRAF ($n = 5$) frente a BRAF WT ($n = 10$). Diferencias en los niveles de IL-7. Las líneas horizontales indican la mediana de cada grupo.

5.6. Valores predictivos de los niveles de citocinas después del análisis de supervivencia

La supervivencia relativa estandarizada por edad a 5 años de los pacientes con melanoma tiene diferencias significativas entre las diferentes regiones. En Europa, la tasa de supervivencia relativa más alta se encuentra en Irlanda del Norte (90,7%), la más baja en Bulgaria (49,6%). Además, es diferente entre las diferentes etapas del melanoma. En los Estados Unidos, la supervivencia relativa a 5 años para el melanoma primario sin compromiso de los ganglios linfáticos es del 98% en pacientes con melanoma en estadio 1 y del 90% en estadio 2 [377]. En nuestro estudio, los

pacientes con melanoma se estratificaron en dos grupos basado en la mediana de las concentraciones de citocinas, es decir, aquellas con niveles altos de citocinas por encima de la mediana y aquellos por debajo de la mediana. Se trazaron curvas de Kaplan-Meier para el análisis estadístico de la supervivencia del paciente. Se demostró que MIP-1 α ($p = 0.03$) y MCP-1 ($p = 0.008$) influyen en la supervivencia, y los pacientes con melanoma con las tasas de supervivencia más bajas muestran altas concentraciones de MIP-1 α y MCP-1 (Figura 22). El resto de los factores estudiados no se correlacionaron con la supervivencia de los pacientes de melanoma.

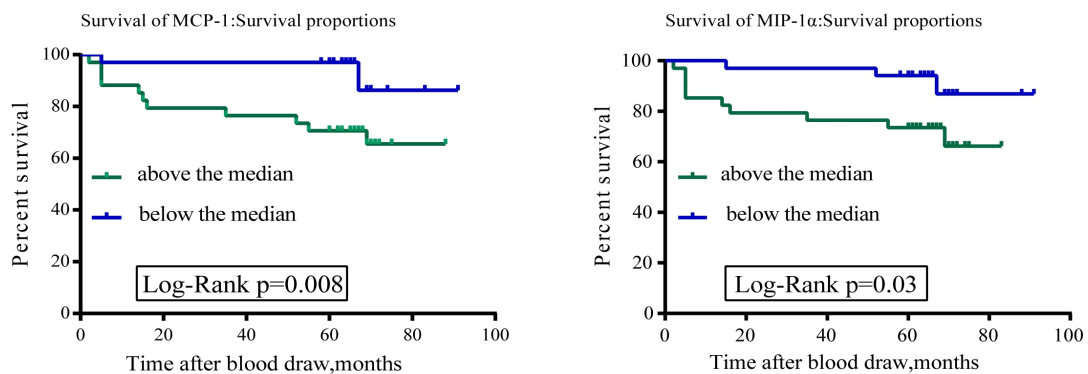


Figura 22. Survival curves for melanoma patients based on the median levels of each cytokine.

6. Discusión

En el estudio de los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de cultivos celulares de melanoma, nuestros resultados mostraron que ambos tipos de cultivos de melanoma MEC1 (melanomas primarios) y MEC2 (melanomas metastásicos) tenían un perfil común de 27 factores solubles caracterizados principalmente por la alta expresión de VEGF-A, IL-6, MCP-1, IL-8 y SDF-1. Además, cuando comparamos los sobrenadantes, observamos diferencias significativas en las concentraciones de VEGF-A, BDNF, FGF-2 y NGF- β . En los sueros autólogos se detectaron 21 factores solubles, la mayoría de los cuales se habían detectado en el sobrenadante de los cultivos de melanoma. Sorprendentemente, PDGF-BB y EGF solo se encontraron en suero, mientras que IL-2, IL-4, IL-8, IL31, FGF2 y GRO- α solo se expresaron en el sobrenadante de los cultivos de las líneas de melanoma. También se encontraron diferencias significativas en PDGF-BB, MIP-1 β , HGF, PIGF-1, BDNF, EGF, Eotaxin e IP-10 después de comparar los sueros autólogos con los controles sanos. Según esto, no se encontró correlación cuantitativa entre los sobrenadantes de cultivos y las muestras de suero autólogo, lo que sugiere que algunos factores pueden actuar localmente y otros sistémicamente y que las concentraciones de estos factores solubles pueden estar reguladas por una compleja red biológica.

En el estudio realizado con muestras de suero de 72 pacientes, en comparación con el grupo control, los pacientes con melanoma tenían niveles más altos de VEGF-A, PDGF-BB, IL-1RA, PIGF-1, IFN-c, TNF- α , MIP 1 α y SCF, pero niveles más bajos de BDNF, SDF-1 α , MCP-1, Eotaxina, EGF e IL-7. Además, los niveles de TNF- α ($P = 0.320$, $r=0.019$), IFN-c ($P = 0.311$, $r=0.023$), VEGF-A ($P = 0.014$, $r=0.337$) y BDNF ($P=0.004$, $r= - 0.391$) presentaron una correlación significativa con el espesor de Breslow. La IL 7 presentó niveles más bajos en los pacientes que portaban mutaciones de BRAF. Los pacientes de melanoma con niveles altos de MIP-1 α y MCP-1 mostraron una peor supervivencia .

De acuerdo con nuestros resultados, se ha informado previamente que las citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y LIF son producidas constitutivamente por células de melanoma [378-380]. De hecho, la producción de IL-6 e IL-8 en cultivos de melanoma proporciona una señal estimuladora en neutrófilos y fibroblastos, que facilitan la adhesión e

invasión de las células del melanoma [378, 379]. Además, la IL-6 expande las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC) y la IL-8 recluta estas células inmunosupresoras en el microambiente tumoral [381]. La IL-8 también promueve el crecimiento de las células del melanoma, induce la proliferación y supervivencia de las células endoteliales y regula positivamente la expresión de metaloproteinasas de la matriz como MMP-2 y MMP-9, que pueden mejorar la angiogénesis y metástasis tumorales [382, 383]. Por el contrario, LIF tiene roles contradictorios según el contexto. Puede inducir la detención del ciclo celular, la apoptosis y la inhibición de las células del melanoma [384] o estimular el crecimiento del melanoma y la estabilización del fenotipo [380, 385]. En nuestro trabajo no se detecta en el suero autólogo ni en los sueros de la cohorte de pacientes IL-8 lo que indica que esta citocina actúa sobre todo a nivel local y posiblemente de forma autocrina. Algo parecido puede ocurrir con la IL-6 y LIF que aunque se detectan en los sueros autólogos su concentración es extremadamente baja.

Las células de melanoma también producen quimiocinas como GRO- α , MCP-1, MIP-1 β y SDF-1. GRO- α no solo está involucrado en el crecimiento y metástasis del melanoma [386], sino que también su producción por células primarias de melanoma regula estos procesos de manera paracrina [387]. Según nuestros datos GRO- α estaría en una situación similar a la IL8 porque sólo se detecta en el sobrenadante de las líneas de melanoma. Además, se ha confirmado que la presencia de MCP-1 y MIP-1 β en el microambiente tumoral se expresa preferentemente en tumores que contenían infiltración de macrófagos y células T [388, 389]. La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1; también denominada CCL2) es producida por monocitos, fibroblastos, células epiteliales y varias células tumorales, y juega un papel importante en el reclutamiento y activación de macrófagos y monocitos durante la inmunidad antitumoral [390]. Estos 2 factores promueven un ambiente inflamatorio, induciendo la estimulación de la respuesta inmune mediada por células T [391]. Sin embargo, el mantenimiento a largo plazo de los mismos mediadores crea condiciones de inflamación crónica que promueven el enriquecimiento y la activación de células inmunosupresoras (como las MDSC) y los factores que apoyan el desarrollo, la invasión y la angiogénesis del tumor [388, 392]. Finalmente, se ha descrito que SDF-1 modula la inmunidad tumoral, repele las células T citotóxicas a través de un mecanismo denominado quimiorepulsión [393], así como la invasión del melanoma a través de la regulación

ascendente de la actividad de la metaloproteinasas de matriz de tipo 1 de membrana (MT1-MMP) [394].

En el estudio de valores predictivos de los niveles de citocinas después del análisis de supervivencia. Encontramos que los niveles altos de MCP-1 y MIP-1 α se relacionaron con tasas de supervivencia bajas. MCP-1 se ha discutido en el párrafo anterior, La proteína-1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α) es una quimiocina de la familia RANTES que se correlaciona negativamente con la supervivencia en pacientes con mieloma múltiple [395]. En este estudio, MIP-1 α se correlacionó con las tasas de supervivencia de los pacientes con melanoma. En estudios de aneurismas carotídeos, se encontró que MCP-1 juega un papel importante en la promoción de la cicatrización del tejido inflamatorio intraaneurismático que podría bloquearse con anticuerpos MIP-1 α y MIP-2 [396]. Nuestros resultados sugieren que MIP-1 α y MCP-1 tienen valor predictivo en el melanoma, y su papel como agentes terapéuticos potenciales ahora justifica una mayor investigación.

En cuanto a la producción de factores de crecimiento, hemos observado altos niveles de VEGF-A y niveles variables de HGF en las muestras de los sobrenadantes. VEGF-A es uno de los factores angiogénicos más potentes, que regula la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Este factor se ha asociado previamente con la adquisición de un fenotipo agresivo con potencial metastásico mejorado, así como con la proliferación, migración e invasión de células de melanoma [397-399]. El VEGF-A también se ha relacionado con la repolarización de linfocitos Th1 a Th2, que previenen la eliminación de células tumorales en el melanoma metastásico [400]. La producción aberrante de HGF contribuye a la tumorigénesis del melanoma maligno a través de su receptor MET. La estimulación del eje HGF-MET se ha descrito como un punto clave en la transición del epitelio al mesenquimal y la adquisición de resistencia a fármacos, lo que sugiere una tendencia hacia un peor pronóstico para estos pacientes [401-403].

Además, VEGF-A juega un papel importante en el desarrollo del melanoma, lo que también ha sido confirmado por nuestro estudio de los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con melanoma maligno humano y las encontradas en casos control. Los resultados mostraron niveles más altos de VEGF-A, PDGF-BB, IL-1RA, PIGF-1,

IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α y SCF, pero niveles disminuidos de BDNF, SDF-1 α , MCP-1, Eotaxin, EGF e IL-7 en los pacientes de melanoma comparados con los controles. Entre ellos, VEGF-A y PDGF-BB fueron más altos en pacientes con melanoma avanzado (estadio III y IV) en comparación con pacientes tempranos (estadio I y II) y controles, y se correlacionaron positivamente con el índice de Breslow. Se sabe que la señalización de VEGF-A estimula la proliferación celular y la formación de neovasculatura que facilita el crecimiento tumoral, la progresión de la enfermedad y los procesos metastásicos [404-406]. Los inhibidores de VEGF / VEGFR, incluido bevacizumab, han sido aprobados en la terapia contra el cáncer y pueden mejorar el pronóstico del paciente en cánceres específicos. Sin embargo, su uso se ha visto limitado por sus bajas tasas de eficacia terapéutica [404].

El PDGF-BB es un factor angiogénico no VEGF producido por las plaquetas, pero también por muchos otros tipos de células, incluidas las células endoteliales, las células del músculo liso o los macrófagos activados, y que puede estimular la proliferación celular y la formación de capilares para promover la metástasis tumoral. Al comparar las citocinas en suero y medio de cultivo, sorprendentemente, PDGF-BB y EGF se encontraron exclusivamente en el suero, Esto significa que las células de melanoma no producen PDGF-BB y EGF, lo que indica que su producción podría ser una respuesta sistémica al desarrollo de melanoma [407]. En este estudio, fueron evidentes niveles más altos de PDGF-BB en el melanoma metastásico en comparación con los pacientes con melanoma primario. Esto puede explicar en parte por qué el uso de inhibidores de VEGF como monoterapias muestra solo una efectividad limitada, ya que más de un factor angiogénico puede mediar la progresión tumoral. Por lo tanto, los regímenes de tratamiento antiangiogénico más recientes deben centrarse en el uso de inhibidores multidireccionales para bloquear simultáneamente varias vías angiogénicas. En este sentido, se ha informado de los mayores beneficios de un bloqueo simultáneo de las vías VEGFR y PDGFR en modelos murinos con el melanoma B16 . [407, 408].

Aquí, informamos que, además de la producción de VEGF-A, las células de melanoma también producen BDNF, FGF-2 y NGF- β , que podrían ser esenciales en el proceso metastásico del melanoma (Figura 17). Como VEGF-A, FGF-2 es un factor proangiogénico producido por células de melanoma, que también se ha asociado con la progresión tumoral [409]. De acuerdo

con nuestros resultados, este factor se ha encontrado significativamente mayor en pacientes con metástasis ganglionares que en pacientes sin afectación ganglionar [410]. Por el contrario, el BDNF y el NGF- β son factores de crecimiento que pertenecen a la familia de las neurotrofinas, que son producidos no solo por las células del melanoma sino también por los fibroblastos y los queratinocitos [411]. Varios estudios han demostrado que estas neurotrofinas pueden promover la invasión al inducir la producción de enzimas degradantes de la matriz extracelular como la heparinasa, enzima capaz de destruir localmente tanto la matriz extracelular como la membrana basal de la barrera hematoencefálica, potenciando así la extravasación de células de melanoma con potencial metastásico cerebral [412, 413]. En nuestro estudio de la relación entre los niveles de citocinas y el índice de Breslow observamos niveles elevados de IFN- γ , TNF- β y VEGF-A, y niveles disminuidos de BDNF que se correlacionaron con un aumento del índice de Breslow. Además el BDNF está disminuido de forma significativa en los sueros de pacientes con melanoma primario y en melanomas metastásicos. La correlación negativa del BDNF con el índice de Breslow y su concentración disminuida en pacientes de melanoma sugieren que tiene una función protectora durante el desarrollo del melanoma. El BDNF es un mediador clave del eje hipotálamo-adipocito, con estudios que indican que este eje neuroendocrino muestra funciones anti-obesidad y anti-cáncer en modelos animales de melanoma y cáncer de colon. Un vector viral de adenovirus se utilizó como vector del gen de BDNF para conseguir su sobreexpresión en modelos de cáncer de mama murinos, dando como resultado una reducción importante de la proliferación de las células tumorales y de la angiogénesis lo que tuvo como resultado la prevención de metástasis. Desde entonces, se ha demostrado que el BDNF tiene importancia terapéutica para una variedad de cánceres [414, 415]. IFN- γ y TNF - β también se elevaron en pacientes con melanoma, observándose una correlación positiva entre sus concentraciones y la progresión tumoral, como se observó en los casos de melanoma uveal [416-418].

Solo la IL-7 mostró niveles más bajos en pacientes con mutaciones de BRAF. La concentración de IL-7 disminuyó con el estadio del tumor, aunque las diferencias significativas en su producción se limitaron a los melanomas metastásicos en comparación con los controles. La IL-7 es una citocina de la familia IL-2, el tratamiento de IL-7 con IL-2 en dosis bajas o altas en

pacientes con melanoma metastásico se ha descrito como una inmunoterapia útil. Por lo tanto, la disminución de los niveles de IL-7 puede facilitar el desarrollo del melanoma y la diseminación metastásica. Si bien la IL7 es un importante candidato a inmunomodulador para la terapia del cáncer, su uso en la clínica está limitado por su corta vida media en el suero. En consecuencia, los tratamientos directos han sido superados por citocinas recombinantes. Al respecto, Feng et al. 2017 utilizó citocinas híbridas de IL-7 / HGF β humana recombinante para mejorar la inmunidad antitumoral en ratones. Yinhon y col. 2016 utilizó citocinas híbridas IL-7 / IL-15 recombinantes para el tratamiento del melanoma en ratones, y ambas mostraron una eficacia prometedora [419-421].

7. Conclusiones

1.- Las células de melanoma avanzado en cultivo producen de forma espontanea un gran número de citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos y de crecimiento . Cuando se analiza el mismo panel de factores solubles en los sueros autólogos no se encuentra una correlación cuantitativa con los producidos por las líneas de melanoma.

2.- La IL-2, IL-4, IL-8, IL31, FGF2 y GRO- α son producidas por las células de melanoma y no se detectan en los sueros autólogos lo que indica que tienen un efecto auto o paracrino.

3.- PDGF-BB y EGF se encontraron exclusivamente en muestras de suero de melanoma, lo que sugiere que se originarían como consecuencia de una respuesta sistémica del paciente frente a esta neoplasia.

4.- Los niveles de VEGF-A y PDGF-BB en el suero de pacientes con melanoma tanto primario como metastásico están elevados y por tanto podrían utilizarse como biomarcadores de progresión tumoral y como dianas terapéuticas.

5.- Otros factores como de BDNF, SDF-1 α , MCP-1, Eotaxin, y EGF están disminuidos en los sueros de los pacientes de melanoma en relación a los controles sanos y también combinados con los anteriores pueden ayudar a predecir el desarrollo de metástasis.

6.-TNF- α , IFN-gamma y VEGF-A se correlacionaron positivamente con el grosor de Breslow, mientras que el BDNF mostró una asociación negativa

7.- MIP-1 α y MCP-1 demostraron una correlación negativa con la supervivencia

8.- Se encontraron bajo niveles de IL-7 en pacientes portadores de mutantes BRAF.

9.- Existe una falta de correlación entre la producción in vitro de BDNF, FGF-2 y NGF- β por las células de melanoma y las concentraciones en los sueros autólogos, lo que sugiere que: (i) probablemente, estos factores solubles tienen una acción local que modifica el microambiente tumoral y permite la diseminación del melanoma al sistema linfático o hematológico, y (ii) sus concentraciones sistémicas pueden estar reguladas por un complejo mecanismo derivado de la interacción entre células tumorales, sistema inmunológico, sistema nervioso central sistema y sistema endocrino.

Estudios posteriores serán necesarios para dilucidar el mecanismo que condiciona el complejo patrón de producción de citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos y de crecimiento por las células de melanoma y por el sistema inmunológico del paciente y de esta forma alcanzar una mayor comprensión del desarrollo y la invasión del melanoma que pueda dirigir una mejor estrategia de tratamiento que frene el crecimiento tumoral y impida el desarrollo de metástasis

8. Bibliografía

Referencias bibliográficas:

- [1] Chiriboga L, Meehan S, Osman I, Glick M, de la Cruz G, Howell BS, Friedman-Jiménez G, Schneider RJ, Jamal S. Endothelin-1 in the tumor microenvironment correlates with melanoma invasion. *Melanoma Res* 2016;26: 236-44.
- [2] Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002;12: 390-9; quiz 400-1.
- [3] Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007;445: 843-50.
- [4] Li P, Znaor A, Holcatova I, Fabianova E, Mates D, Wozniak MB, Ferlay J, Scelo G. Regional geographic variations in kidney cancer incidence rates in European countries. *Eur Urol* 2015;67: 1134-1141.
- [5] Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl* 2013;11: 81-91.
- [6] Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2007;82: 490-513.
- [7] Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 2014;28: 1005-11.
- [8] Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol* 2014;93: 23-9.
- [9] Sandri S, Faião-Flores F, Tiago M, Pennacchi PC, Massaro RR, Alves-Fernandes DK, Berardinelli GN, Evangelista AF, de Lima VV, Reis RM, Maria-Engler SS. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacol Res* 2016;111: 523-533.
- [10] Falzone L, Salemi R, Travali S, Scalisi A, McCubrey JA, Candido S, Libra M. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. *Aging (Albany NY)* 2016;8: 933-44.
- [11] Guarneri C, Bevelacqua V, Polesel J, Falzone L, Cannavó PS, Spandidos DA, Malaponte G, Libra M. NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP-9 downregulation in cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 2017;37: 737-746.
- [12] Lee KR, Lee JS, Kim YR, Song IG, Hong EK. Polysaccharide from *Inonotus obliquus* inhibits migration and invasion in B16-F10 cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 via downregulation of NF- κ B signaling pathway. *Oncol Rep* 2014;31: 2447-53.

- [13] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LJ, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339: 1546-58.
- [14] Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012;150: 251-63.
- [15] Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchicocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012;44: 1006-14.
- [16] Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, B 盲 secke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011;2: 135-64.
- [17] Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5: 875-85.
- [18] Carlino MS, Long GV, Kefford RF, Rizos H. Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;96: 385-98.
- [19] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27: 5497-510.
- [20] Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J* 2012;18: 142-7.
- [21] Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2002;8: 3728-33.
- [22] Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33: 19-20.
- [23] Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Br  cker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353: 2135-47.
- [24] Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, Hucks D, Berry E,

Terry C, Duke M, Su Y, Sobolik-Delmaire T, Richmond A, Kelley MC, Vnencak-Jones CL, Iafrate AJ, Sosman J, Pao W. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One* 2012;7: e35309.

[25] Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, Kluger HM, Narayan D, Halaban R. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010;8: 67.

[26] Jakob JA, Bassett RJ, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, Rohlfs ML, Richard J, Gershenwald JE, Kim KB, Lazar AJ, Hwu P, Davies MA. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118: 4014-23.

[27] Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene* 2013;32: 3009-18.

[28] Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, Bronson RT, McMahon M, Granter S, Flaherty K, Wargo JA, Marais R, Cichowski K. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* 2013;3: 338-49.

[29] Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, Tiwari S, Kong L, Hanrahan AJ, Yao Z, Merghoub T, Ribas A, Chapman PB, Yaeger R, Taylor BS, Schultz N, Berger MF, Rosen N, Solit DB. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res* 2014;74: 2340-50.

[30] Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, McCusker JP, Ma S, Cheng E, Straub R, Serin M, Bosenberg M, Ariyan S, Narayan D, Sznol M, Kluger HM, Mane S, Schlessinger J, Lifton RP, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet* 2015;47: 996-1002.

[31] Gibney GT, Smalley KS. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov* 2013;3: 260-3.

[32] Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, Town A, Harlow A, Cruz FR, Azar S, Rubin BP, Muller S, West R, Heinrich MC, Corless CL. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008;14: 6821-8.

[33] Handolias D, Salemi R, Murray W, Tan A, Liu W, Viros A, Dobrovic A, Kelly J, McArthur GA. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23: 210-5.

[34] Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* 2015;373: 1926-36.

- [35] Castellano M, Pollock PM, Walters MK, Sparrow LE, Down LM, Gabrielli BG, Parsons PG, Hayward NK. CDKN2A/p16 is inactivated in most melanoma cell lines. *Cancer Res* 1997;57: 4868-75.
- [36] Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003;22: 3113-22.
- [37] Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 2003;63: 2881-90.
- [38] Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004;122: 337-41.
- [39] Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, Chodon T, Guo R, Johnson DB, Dahlman KB, Kelley MC, Kefford RF, Chmielowski B, Glaspy JA, Sosman JA, van Baren N, Long GV, Ribas A, Lo RS. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 2014;4: 80-93.
- [40] Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007;82: 364-80.
- [41] LM D. The classification of cutaneous melanoma. *North Am J Clin Oncol* 2009;23: 100-10.
- [42] Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 1996;78: 427-32.
- [43] Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Houghton AJ, Kirkwood JM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen D, Ross MI, Sober A, Soong SJ, Thompson JA, Thompson JF, Gershenwald JE, McMasters KM. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 2000;88: 1484-91.
- [44] Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001;19: 3622-34.
- [45] Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MJ, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27: 6199-206.
- [46] Mervic L. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2012;21: 27-31.
- [47] Spatz A, Cook MG, Elder DE, Piepkorn M, Ruitter DJ, Barnhill RL. Interobserver

reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. *Eur J Cancer* 2003;39: 1861-5.

[48] Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatol Ther* 2005;18: 369-85.

[49] Scolyer RA, Shaw HM, Thompson JF, Li LX, Colman MH, Lo SK, McCarthy SW, Palmer AA, Nicoll KD, Dutta B, Slobedman E, Watson GF, Stretch JR. Interobserver reproducibility of histopathologic prognostic variables in primary cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27: 1571-6.

[50] Chao C, Martin RN, Ross MI, Reintgen DS, Edwards MJ, Noyes RD, Hagendoorn LJ, Stromberg AJ, McMasters KM. Correlation between prognostic factors and increasing age in melanoma. *Ann Surg Oncol* 2004;11: 259-64.

[51] Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Metzler G, Moehrle M, Breuninger H, Garbe C. Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer* 2008;112: 1795-804.

[52] Nomellini V, Gomez CR, Kovacs EJ. Aging and impairment of innate immunity. *Contrib Microbiol* 2008;15: 188-205.

[53] Kölmel KF, Kulle B, Lippold A, Seebacher C. Survival probabilities and hazard functions of malignant melanoma in Germany 1972-1996, an analysis of 10433 patients. Evolution of gender differences and malignancy. *Eur J Cancer* 2002;38: 1388-94.

[54] Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, Urist MM, Ariyan S, Sussman JJ, Edwards MJ, Chagpar AB, Martin RC, Stromberg AJ, Hagendoorn L, McMasters KM. Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg* 2006;243: 693-8; discussion 698-700.

[55] MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 6: vi1-7.

[56] Mervic L, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Forschner A, Metzler G, Bartenjev I, Büttner P, Garbe C. Sex differences in survival of cutaneous melanoma are age dependent: an analysis of 7338 patients. *Melanoma Res* 2011;21: 244-52.

[57] de Vries E, Nijsten TE, Visser O, Bastiaannet E, van Hattem S, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. Superior survival of females among 10,538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Ann Oncol* 2008;19: 583-9.

[58] Micheli A, Ciampichini R, Oberaigner W, Ciccolallo L, de Vries E, Izzarugaza I, Zambon P, Gatta G, De Angelis R. The advantage of women in cancer survival: an analysis of EURO CARE-4 data. *Eur J Cancer* 2009;45: 1017-27.

- [59] Joesse A, De Vries E, van Eijck CH, Eggermont AM, Nijsten T, Coebergh JW. Reactive oxygen species and melanoma: an explanation for gender differences in survival? *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23: 352-64.
- [60] Malaguarnera L, Ferlito L, Di Mauro S, Imbesi RM, Scalia G, Malaguarnera M. Immunosenescence and cancer: a review. *Arch Gerontol Geriatr* 2001;32: 77-93.
- [61] Leiter U, Meier F, Schittek B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 2004;86: 172-8.
- [62] Bernengo MG, Reali UM, Doveil GC, Cappello N, Lisa F, Moretti S. BANS: a discussion of the problem. *Melanoma Res* 1992;2: 157-62.
- [63] Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017;67: 93-99.
- [64] Kauffmann RM, Chen SL. Workup and staging of malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 2014;94: 963-72, vii.
- [65] Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MJ, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27: 6199-206.
- [66] Coit DG, Thompson JA, Algazi A, Andtbacka R, Bichakjian CK, Carson WR, Daniels GA, DiMaio D, Ernstoff M, Fields RC, Fleming MD, Gonzalez R, Guild V, Halpern AC, Hodi FJ, Joseph RW, Lange JR, Martini MC, Materin MA, Olszanski AJ, Ross MI, Salama AK, Skitzki J, Sosman J, Swetter SM, Tanabe KK, Torres-Roca JF, Trisal V, Urist MM, McMillian N, Eng A. Melanoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14: 450-73.
- [67] Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WR, Daud A, Dimaio D, Fleming MD, Guild V, Halpern AC, Hodi FJ, Kelley MC, Khushalani NI, Kudchadkar RR, Lange JR, Lind A, Martini MC, Olszanski AJ, Pruitt SK, Ross MI, Swetter SM, Tanabe KK, Thompson JA, Trisal V, Urist MM, McMillian N, Ho M. Melanoma, version 2.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11: 395-407.
- [68] Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. *Clinical Presentation and Staging of Melanoma*. 2017.
- [69] Bonnichon P, Berger JP, Bonni N, Fontaine M, Pion-Graff J. [History of cancer and chemotherapy before chemotherapy]. *Hist Sci Med* 2014;48: 469-74.
- [70] Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* 2017;8: 7175-7180.

- [71] Simpson E. Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: a commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956) 'Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015;370.
- [72] Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10: 2965.
- [73] Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 1971;7: 3-25.
- [74] Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967;1: 1171-4.
- [75] Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. In. ed. HS Lawrence: Hoeber-Harper New York ; 1959. p. 529-532.
- [76] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3: 991-8.
- [77] Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968;217: 370-1.
- [78] Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974;183: 534-6.
- [79] Rygaard J, Povlsen CO. Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* 1974;17: 135-6.
- [80] Rygaard J, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 1974;82: 99-106.
- [81] Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA. Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81: 886-8.
- [82] Maleckar JR, Sherman LA. The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol* 1987;138: 3873-6.
- [83] Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res* 1978;27: 305-77.
- [84] Janeway CJ. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1: 1-13.
- [85] Dighe AS, Farrar MA, Schreiber RD. Inhibition of cellular responsiveness to interferon-gamma (IFN gamma) induced by overexpression of inactive forms of the IFN gamma receptor. *J Biol Chem* 1993;268: 10645-53.

- [86] Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994;1: 447-56.
- [87] Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 7556-61.
- [88] van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184: 1781-90.
- [89] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000;192: 755-60.
- [90] Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002;20: 323-70.
- [91] Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 1914-8.
- [92] Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971;28: 89-98.
- [93] Pautu JL, Kumar L. Intratumoral T cells and survival in epithelial ovarian cancer. *Natl Med J India* 2003;16: 150-1.
- [94] León-Letelier RA, Bonifaz LC, Fuentes-Pananá EM.OMIC signatures to understand cancer immunosurveillance and immunoediting: Melanoma and immune cells interplay in immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2019;105: 915-933.
- [95] Tosetti F, Benelli R, Albini A. The angiogenic switch in solid tumors: clinical implications. *Suppl Tumori* 2002;1: S9-11.
- [96] Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001;294: 605-9.
- [97] Wrenshall LE, Stevens RB, Cerra FB, Platt JL. Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans. *J Leukoc Biol* 1999;66: 391-400.
- [98] Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001;2: 293-9.
- [99] Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 2002;12: 33-42.

- [100] Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 1987;166: 1084-97.
- [101] Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995;182: 1301-14.
- [102] Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wysoka M, Burdick MD, Strieter RM, Trinchieri G, Puré E. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol* 1997;159: 2492-500.
- [103] Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991;124: 5-24.
- [104] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410: 1107-11.
- [105] Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JJ. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 7673-8.
- [106] Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G, Lee WM. Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 1998;9: 25-34.
- [107] MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15: 323-50.
- [108] Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195: 327-33.
- [109] Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18: 593-620.
- [110] Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392: 86-9.
- [111] O'Donnell JS, Teng M, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16: 151-167.
- [112] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3: 991-8.
- [113] Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991;51: 3075-9.

- [114] MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med* 2003;348: 567-8.
- [115] Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248: 1349-56.
- [116] Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 2001;214: 194-200.
- [117] Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CE, Lin AY, Bäumlér C, Siegert E, Marx A, Vaishnav AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001;98: 194-200.
- [118] Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Offringa R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 1999;190: 1033-8.
- [119] Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997;90: 4266-70.
- [120] Grønbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998;92: 3018-24.
- [121] Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154: 1785-91.
- [122] Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2001;1: 142-50.
- [123] Greil R, Egle A, Villunger A. On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. *Leuk Lymphoma* 1998;31: 477-90.
- [124] Bullani RR, Wehrli P, Viard-Leveugle I, Rimoldi D, Cerottini JC, Saurat JH, Tschopp J, French LE. Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res* 2002;12: 263-70.
- [125] Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996;32A: 2513-9.
- [126] Dikov MM, Oyama T, Cheng P, Takahashi T, Takahashi K, Sepetavec T, Edwards B, Adachi Y, Nadaf S, Daniel T, Gabrilovich DI, Carbone DP. Vascular endothelial growth factor effects on nuclear factor-kappaB activation in hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res* 2001;61: 2015-21.

- [127] Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6: 1755-66.
- [128] Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 1997;18: 102-4.
- [129] De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997;27: 1229-35.
- [130] Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264: 961-5.
- [131] Ristimäki A, Honkanen N, Jänkälä H, Sipponen P, Härkönen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57: 1276-80.
- [132] Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 1999;10: 303-60.
- [133] Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 1993;14: 491-9.
- [134] Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18: 89-95.
- [135] Gomez DE, Vázquez AM, Alonso DF. Cancer antigen prioritization: a road map to work in defining vaccines against specific targets. A point of view. *Front Oncol* 2012;2: 66.
- [136] Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM, Matrisian LM. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 2009;15: 5323-37.
- [137] Hodi FS. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *Clin Cancer Res* 2006;12: 673-8.
- [138] Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 2006;12: 764-71.
- [139] Ordóñez NG. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum Pathol* 2014;45: 191-205.
- [140] Fogal S, Carotti M, Giaretta L, Lanciai F, Nogara L, Bubacco L, Bergantino E. Human tyrosinase produced in insect cells: a landmark for the screening of new drugs addressing its activity. *Mol Biotechnol* 2015;57: 45-57.

- [141] Del MV, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett* 1996;381: 165-8.
- [142] Beermann F, Schmid E, Schütz G. Expression of the mouse tyrosinase gene during embryonic development: recapitulation of the temporal regulation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89: 2809-13.
- [143] Battyani Z, Xerri L, Hassoun J, Bonerandi JJ, Grob JJ. Tyrosinase gene expression in human tissues. *Pigment Cell Res* 1993;6: 400-5.
- [144] Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411: 380-4.
- [145] Nishimura MI, Kawakami Y, Charmley P, O'Neil B, Shilyansky J, Yannelli JR, Rosenberg SA, Hood L. T-cell receptor repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes. Analysis of melanoma-specific long-term lines. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994;16: 85-94.
- [146] Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, Rosenberg SA. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994;180: 347-52.
- [147] Itoh K, Platsoucas CD, Balch CM. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* 1988;168: 1419-41.
- [148] Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994;86: 1159-66.
- [149] Kobayashi H, Lu J, Celis E. Identification of helper T-cell epitopes that encompass or lie proximal to cytotoxic T-cell epitopes in the gp100 melanoma tumor antigen. *Cancer Res* 2001;61: 7577-84.
- [150] Baba T, Sato-Matsushita M, Kanamoto A, Itoh A, Oyaizu N, Inoue Y, Kawakami Y, Tahara H. Phase I clinical trial of the vaccination for the patients with metastatic melanoma using gp100-derived epitope peptide restricted to HLA-A*2402. *J Transl Med* 2010;8: 84.
- [151] Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002;298: 850-4.
- [152] Chen Y, Chalouni C, Tan C, Clark R, Venook R, Ohri R, Raab H, Firestein R, Mallet W, Polakis P. The melanosomal protein PMEL17 as a target for antibody drug conjugate therapy in melanoma. *J Biol Chem* 2012;287: 24082-91.

- [153] Shi F, Xu Z, Chen H, Wang X, Cui J, Zhang P, Zhang P, Xie X. A monoclonal antibody against PMEL. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2014;33: 354-60.
- [154] Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62: 1707-23.
- [155] Hearing VJ. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol* 1987;142: 154-65.
- [156] Reinke S, Königer P, Herberth G, Audring H, Wang H, Ma J, Guo Y, Sterry W, Trefzer U. Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *Am J Dermatopathol* 2005;27: 401-6.
- [157] Pfirschke C, Gebhardt C, Zörnig I, Pritsch M, Eichmüller SB, Jäger D, Enk A, Beckhove P. T cell responses in early-stage melanoma patients occur frequently and are not associated with humoral response. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64: 1369-81.
- [158] Tjin EP, Konijnenberg D, Krebbers G, Mallo H, Drijfhout JW, Franken KL, van der Horst CM, Bos JD, Nieweg OE, Kroon BB, Haanen JB, Melief CJ, Vyth-Dreese FA, Luiten RM. T-cell immune function in tumor, skin, and peripheral blood of advanced stage melanoma patients: implications for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;17: 5736-47.
- [159] Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 2000;182: 323-31.
- [160] Schaed SG, Klimek VM, Panageas KS, Musselli CM, Butterworth L, Hwu WJ, Livingston PO, Williams L, Lewis JJ, Houghton AN, Chapman PB. T-cell responses against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS-21 as immunological adjuvants. *Clin Cancer Res* 2002;8: 967-72.
- [161] Lewis JJ, Janetzki S, Schaed S, Panageas KS, Wang S, Williams L, Meyers M, Butterworth L, Livingston PO, Chapman PB, Houghton AN. Evaluation of CD8(+) T-cell frequencies by the Elispot assay in healthy individuals and in patients with metastatic melanoma immunized with tyrosinase peptide. *Int J Cancer* 2000;87: 391-8.
- [162] Sarangarajan R, Zhao Y, Babcock G, Cornelius J, Lamoreux ML, Boissy RE. Mutant alleles at the brown locus encoding tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) affect proliferation of mouse melanocytes in culture. *Pigment Cell Res* 2000;13: 337-44.
- [163] Fang D, Hallman J, Sangha N, Kute TE, Hammarback JA, White WL, Setaluri V. Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 2001;158: 2107-15.
- [164] Ben-Ami E, Schachter J. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes for melanoma:

new players, old game. *Immunotherapy* 2015;7: 477-9.

[165] Hearing VJ. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci* 2005;37: 3-14.

[166] Pak BJ, Chu W, Lu SJ, Kerbel RS, Ben-David Y. Lineage-specific mechanism of drug and radiation resistance in melanoma mediated by tyrosinase-related protein 2. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20: 27-32.

[167] Khalil DN, Postow MA, Ibrahim N, Ludwig DL, Cosaert J, Kambhampati SR, Tang S, Grebennik D, Kauh JS, Lenz HJ, Flaherty KT, Hodi FS, Lawrence DP, Wolchok JD. An Open-Label, Dose-Escalation Phase I Study of Anti-TYRP1 Monoclonal Antibody IMC-20D7S for Patients with Relapsed or Refractory Melanoma. *Clin Cancer Res* 2016;22: 5204-5210.

[168] Busam KJ, Chen YT, Old LJ, Stockert E, Iversen K, Coplan KA, Rosai J, Barnhill RL, Jungbluth AA. Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1998;22: 976-82.

[169] Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 2005;280: 14006-16.

[170] Plaza JA, Suster D, Perez-Montiel D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15: 421-5.

[171] Bissig C, Rochin L, van Niel G. PMEL Amyloid Fibril Formation: The Bright Steps of Pigmentation. *Int J Mol Sci* 2016;17.

[172] Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 2001;152: 809-24.

[173] Fukuda K, Funakoshi T, Sakurai T, Nakamura Y, Mori M, Tanese K, Tanikawa A, Taguchi J, Fujita T, Okamoto M, Amagai M, Kawakami Y. Peptide-pulsed dendritic cell vaccine in combination with carboplatin and paclitaxel chemotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Res* 2017;27: 326-334.

[174] Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, Nicolay HJ, Sigalotti L, Maio M. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol* 2011;5: 164-82.

[175] Gjerstorff MF, Ditzel HJ. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. *Tissue Antigens* 2008;71: 187-92.

[176] Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, Ditzel HJ. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod* 2007;22: 953-60.

- [177] Zhang S, Zhou X, Yu H, Yu Y. Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer* 2010;10: 163.
- [178] Cheng YH, Wong EW, Cheng CY. Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2011;1: 209-220.
- [179] Krishnadas DK, Bai F, Lucas KG. Cancer testis antigen and immunotherapy. *Immunotargets Ther* 2013;2: 11-9.
- [180] Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009;100: 2014-21.
- [181] Sang M, Wang L, Ding C, Zhou X, Wang B, Wang L, Lian Y, Shan B. Melanoma-associated antigen genes - an update. *Cancer Lett* 2011;302: 85-90.
- [182] van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde BJ, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Immunol* 2007;178: 2617-21.
- [183] Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999;10: 281-7.
- [184] Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001;61: 5544-51.
- [185] Li X, Hughes SC, Wevrick R. Evaluation of melanoma antigen (MAGE) gene expression in human cancers using The Cancer Genome Atlas. *Cancer Genet* 2015;208: 25-34.
- [186] Ruault M, van der Bruggen P, Brun ME, Boyle S, Roizès G, De Sario A. New BAGE (B melanoma antigen) genes mapping to the juxtacentromeric regions of human chromosomes 13 and 21 have a cancer/testis expression profile. *Eur J Hum Genet* 2002;10: 833-40.
- [187] Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995;2: 167-75.
- [188] Gjerstorff MF, Pøhl M, Olsen KE, Ditzel HJ. Analysis of GAGE, NY-ESO-1 and SP17 cancer/testis antigen expression in early stage non-small cell lung carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13: 466.
- [189] Piotti KC, Scognamiglio T, Chiu R, Chen YT. Expression of cancer/testis (CT) antigens in squamous cell carcinoma of the head and neck: evaluation as markers of squamous dysplasia. *Pathol Res Pract* 2013;209: 721-6.
- [190] Zambon A, Mandruzzato S, Parenti A, Macino B, Dalerba P, Ruol A, Merigliano S, Zaninotto G, Zanovello P. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal

- squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2001;91: 1882-8.
- [191] Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995;182: 689-98.
- [192] Gnjjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 2006;95: 1-30.
- [193] Cebon J, Knights A, Ebert L, Jackson H, Chen W. Evaluation of cellular immune responses in cancer vaccine recipients: lessons from NY-ESO-1. *Expert Rev Vaccines* 2010;9: 617-29.
- [194] Fonteneau JF, Brilot F, Münz C, Gannagé M. The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *J Immunol* 2016;196: 64-71.
- [195] Bioley G, Guillaume P, Luescher I, Bhardwaj N, Mears G, Old L, Valmori D, Ayyoub M. Vaccination with a recombinant protein encoding the tumor-specific antigen NY-ESO-1 elicits an A2/157-165-specific CTL repertoire structurally distinct and of reduced tumor reactivity than that elicited by spontaneous immune responses to NY-ESO-1-expressing Tumors. *J Immunother* 2009;32: 161-8.
- [196] Smith HA, McNeel DG. The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumor therapy. *Clin Dev Immunol* 2010;2010: 150591.
- [197] Türeci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Scmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Rammensee HG, Pfreundschuh M. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res* 1996;56: 4766-72.
- [198] Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 1998;187: 1349-54.
- [199] Dos SN, Torensma R, de Vries TJ, Schreurs MW, de Bruijn DR, Kater-Baats E, Ruiter DJ, Adema GJ, van Muijen GN, van Kessel AG. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res* 2000;60: 1654-62.
- [200] Tandler N, Mosch B, Pietzsch J. Protein and non-protein biomarkers in melanoma: a critical update. *Amino Acids* 2012;43: 2203-30.
- [201] Krug C, Birkholz K, Paulus A, Schwenkert M, Schmidt P, Hoffmann N, Hombach A, Fey G, Abken H, Schuler G, Schuler-Thurner B, Dörrie J, Schaft N. Stability and activity of MCSP-specific chimeric antigen receptors (CARs) depend on the scFv antigen-binding domain and the protein backbone. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64: 1623-35.
- [202] Merhavi-Shoham E, Itzhaki O, Markel G, Schachter J, Besser MJ. Adoptive Cell Therapy for

Metastatic Melanoma. *Cancer J* 2017;23: 48-53.

[203] Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3: a005074.

[204] Rathinam R, Alahari SK. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29: 223-37.

[205] Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24: 195-222.

[206] Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5: 816-26.

[207] Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10: 9-22.

[208] Alvero AB, Kim D, Lima E, Sumi NJ, Lee JS, Cardenas C, Pitruzzello M, Silasi DA, Buza N, Fahmy T, Mor G. Novel approach for the detection of intraperitoneal micrometastasis using an ovarian cancer mouse model. *Sci Rep* 2017;7: 40989.

[209] Price MA, Colvin WL, Yang J, Carlson J, Xiang B, Li G, Ferrone S, Dudek AZ, Turley EA, McCarthy JB. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24: 1148-57.

[210] Campoli M, Ferrone S, Wang X. Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res* 2010;109: 73-121.

[211] Erfurt C, Müller E, Emmerling S, Klotz C, Hertl M, Schuler G, Schultz ES. Melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan as a new target antigen for CD4+ T cells in melanoma patients. *Int J Cancer* 2009;124: 2341-6.

[212] Koch MB, Shih IM, Weiss SW, Folpe AL. Microphthalmia transcription factor and melanoma cell adhesion molecule expression distinguish desmoplastic/spindle cell melanoma from morphologic mimics. *Am J Surg Pathol* 2001;25: 58-64.

[213] Shih IM, Nesbit M, Herlyn M, Kurman RJ. A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol* 1998;11: 1098-106.

[214] Zhang H, Zhang J, Wang Z, Lu D, Feng J, Yang D, Chen X, Yan X. CD146 is a potential marker for the diagnosis of malignancy in cervical and endometrial cancer. *Oncol Lett* 2013;5: 1189-1194.

[215] Howard K, Lo KK, Ao L, Gamboni F, Edil BH, Schulick R, Barnett CJ. Intercellular adhesion molecule-1 mediates murine colon adenocarcinoma invasion. *J Surg Res* 2014;187: 19-23.

[216] Usami Y, Ishida K, Sato S, Kishino M, Kiryu M, Ogawa Y, Okura M, Fukuda Y, Toyosawa S.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *Int J Cancer* 2013;133: 568-78.

[217] Hamaï A, Meslin F, Benlalam H, Jalil A, Mehrpour M, Faure F, Lecluse Y, Vielh P, Avril MF, Robert C, Chouaib S. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res* 2008;68: 9854-64.

[218] Suryo RY, Dunn LL, Richardson DR. The melanoma tumor antigen, melanotransferrin (p97): a 25-year hallmark--from iron metabolism to tumorigenesis. *Oncogene* 2007;26: 6113-24.

[219] Madureira PA, O'Connell PA, Surette AP, Miller VA, Waisman DM. The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012: 353687.

[220] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33: 637-68.

[221] Seregni E, Massaron S, Martinetti A, Illeni MT, Rovini D, Belli F, Agresti R, Greco M, Cascinelli N, Bombardieri E. S100 protein serum levels in cutaneous malignant melanoma. *Oncol Rep* 1998;5: 601-4.

[222] Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000;32: 475-81.

[223] Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007;446: 153-8.

[224] Blanchard T, Srivastava PK, Duan F. Vaccines against advanced melanoma. *Clin Dermatol* 2013;31: 179-90.

[225] Klein CA. Random mutations, selected mutations: A PIN opens the door to new genetic landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 18033-4.

[226] Robert C, Thomas M, Mateus C. MAP-kinase pathway up or down? Just look at the skin of your patients!. *Melanoma Res* 2014;24: 421-3.

[227] Su F, Viros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, Reis-Filho JS, Kong X, Koya RC, Flaherty KT, Chapman PB, Kim MJ, Hayward R, Martin M, Yang H, Wang Q, Hilton H, Hang JS, Noe J, Lambros M, Geyer F, Dhomen N, Niculescu-Duvaz I, Zambon A, Niculescu-Duvaz D, Preece N,

Robert L, Otte NJ, Mok S, Kee D, Ma Y, Zhang C, Habets G, Burton EA, Wong B, Nguyen H, Kockx M, Andries L, Lestini B, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Troy JL, Gonzalez R, Hutson TE, Puzanov I, Chmielowski B, Springer CJ, McArthur GA, Sosman JA, Lo RS, Ribas A, Marais R. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012;366: 207-15.

[228] Flaherty KT. Dividing and conquering: controlling advanced melanoma by targeting oncogene-defined subsets. *Clin Exp Metastasis* 2012;29: 841-6.

[229] Fang M, Hutchinson L, Deng A, Green MR. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113: 1250-5.

[230] Prickett TD, Crystal JS, Cohen CJ, Pasetto A, Parkhurst MR, Gartner JJ, Yao X, Wang R, Gros A, Li YF, El-Gamil M, Trebska-McGowan K, Rosenberg SA, Robbins PF. Durable Complete Response from Metastatic Melanoma after Transfer of Autologous T Cells Recognizing 10 Mutated Tumor Antigens. *Cancer Immunol Res* 2016;4: 669-78.

[231] McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birkbak NJ, Hiley CT, Watkins TB, Shafi S, Murugaesu N, Mitter R, Akarca AU, Linares J, Marafioti T, Henry JY, Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Schadendorf D, Garraway LA, Makarov V, Rizvi NA, Snyder A, Hellmann MD, Merghoub T, Wolchok JD, Shukla SA, Wu CJ, Peggs KS, Chan TA, Hadrup SR, Quezada SA, Swanton C. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 2016;351: 1463-9.

[232] Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 2013;339: 957-9.

[233] Armando RG, Gomez DM, Gomez DE. AZT exerts its antitumoral effect by telomeric and non-telomeric effects in a mammary adenocarcinoma model. *Oncol Rep* 2016;36: 2731-2736.

[234] Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* 2014;14: 525-46.

[235] Bitton RJ, Guthmann MD, Gabri MR, Carnero AJ, Alonso DF, Fainboim L, Gomez DE. Cancer vaccines: an update with special focus on ganglioside antigens. *Oncol Rep* 2002;9: 267-76.

[236] Sonnino S, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A. Gangliosides as regulators of cell signaling: ganglioside-protein interactions or ganglioside-driven membrane organization? *J Neurochem* 2013;124: 432-5.

[237] Hamilton WB, Helling F, Lloyd KO, Livingston PO. Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer* 1993;53: 566-73.

- [238] Blanco R, Rengifo E, Rengifo CE, Cedeño M, Frómata M, Carr A. Immunohistochemical Reactivity of the 14F7 Monoclonal Antibody Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Some Benign and Malignant Skin Neoplasms. *ISRN Dermatol* 2011;2011: 848909.
- [239] Perales MA, Wolchok JD. Melanoma vaccines. *Cancer Invest* 2002;20: 1012-26.
- [240] Chapman PB, Morrissey DM, Panageas KS, Hamilton WB, Zhan C, Destro AN, Williams L, Israel RJ, Livingston PO. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study. *Clin Cancer Res* 2000;6: 874-9.
- [241] Osorio M, Gracia E, Reigosa E, Hernandez J, de la Torre A, Saurez G, Perez K, Viada C, Cepeda M, Carr A, Avila Y, Rodríguez M, Fernandez LE. Effect of vaccination with N-glycolyl GM3/VSSP vaccine by subcutaneous injection in patients with advanced cutaneous melanoma. *Cancer Manag Res* 2012;4: 341-5.
- [242] Vázquez AM, Hernández AM, Macías A, Montero E, Gómez DE, Alonso DF, Gabri MR, Gómez RE. Racotumomab: an anti-idiotypic vaccine related to N-glycolyl-containing gangliosides - preclinical and clinical data. *Front Oncol* 2012;2: 150.
- [243] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100: 57-70.
- [244] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007;117: 60-9.
- [245] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420: 860-7.
- [246] Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002;16: 217-26, 229; discussion 230-2.
- [247] Dobrovolskaia MA, Kozlov SV. Inflammation and cancer: when NF-kappaB amalgamates the perilous partnership. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5: 325-44.
- [248] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5: 749-59.
- [249] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006;441: 431-6.
- [250] Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005;6: 1182-90.
- [251] de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;6: 24-37.
- [252] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7: 211-7.
- [253] Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol* 2006;16: 38-52.

- [254] Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2006;66: 5527-36.
- [255] Hadden JW. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. *Int Immunopharmacol* 2003;3: 1061-71.
- [256] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5: 749-59.
- [257] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446: 475-82.
- [258] Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005;115: 2625-32.
- [259] Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 301-10.
- [260] Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16: 35-53.
- [261] Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, Bubici C, Mossman BT, Pass HI, Testa JR, Franzoso G, Carbone M. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 10397-10402.
- [262] Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 276-85.
- [263] Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 1998;64: 275-90.
- [264] Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G, Balkwill F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 1999;5: 828-31.
- [265] LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003;10: 66-75.
- [266] Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 2002;195: 161-9.
- [267] Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglian SJ, Rotolo JA, Ongchin J, Willis LM, Greenberg AS, Eng JM, Crawford JM, Murphy GF, Yagita H, Walczak H, Peschon JJ, van den Brink MR. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* 2002;8: 1433-7.

- [268] Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004;6: 297-305.
- [269] Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13: 357-68.
- [270] Osborne J, Moore PS, Chang Y. KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways. *Hum Immunol* 1999;60: 921-7.
- [271] Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martínez-Maza O, Cockburn MG, Gauderman WJ, Pike MC, Bernstein L, Nathwani BN, Salam MT, Danley KL, Wang W, Gage J, Gundell-Miller S, Mack TM. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103: 3216-21.
- [272] Berger FG. The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88: 281-5.
- [273] Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006;80: 227-36.
- [274] Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14: 155-74.
- [275] Witowski J, Książek K, Jörres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 567-579.
- [276] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6: 1133-41.
- [277] Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* 2004;279: 2559-67.
- [278] Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999;59: 3698-704.
- [279] Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, Sasaki H. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 2005;175: 6177-89.
- [280] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H,

- Lotze MT. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003;101: 2620-7.
- [281] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3: 133-46.
- [282] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198: 1951-7.
- [283] Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22: 929-79.
- [284] Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AJ. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999;274: 31868-74.
- [285] Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 2005;105: 689-96.
- [286] Kundu N, Fulton AM. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cell Immunol* 1997;180: 55-61.
- [287] Davidson NJ, Hudak SA, Lesley RE, Menon S, Leach MW, Rennick DM. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 1998;161: 3143-9.
- [288] Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr Opin Immunol* 2005;17: 180-6.
- [289] Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 2014;346: 945-9.
- [290] Villanueva J, Herlyn M. Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep* 2008;10: 439-46.
- [291] Jiang H, Gebhardt C, Umansky L, Beckhove P, Schulze TJ, Utikal J, Umansky V. Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int J Cancer* 2015;136: 2352-60.
- [292] Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000;12: 547-54.
- [293] Hu Y, Kim H, Blackwell CM, Slingluff CJ. Long-term outcomes of helper peptide vaccination for metastatic melanoma. *Ann Surg* 2015;262: 456-64; discussion 462-4.
- [294] Neagu M, Constantin C, Caruntu C, Dumitru C, Surcel M, Zurac S. Inflammation: A key process in skin tumorigenesis. *Oncol Lett* 2019;17: 4068-4084.
- [295] Jobe NP, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, Lacina L, Mateu R, Smetana K, Brábek J.

Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol* 2016;146: 205-17.

[296] Somasundaram R, Herlyn M, Wagner SN. The role of tumor microenvironment in melanoma therapy resistance. *Melanoma Manag* 2016;3: 23-32.

[297] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144: 646-74.

[298] Lee C, Collichio F, Ollila D, Moschos S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol* 2013;31: 141-7.

[299] Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res* 2012;22: 114-22.

[300] DeVita VJ, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008;68: 8643-53.

[301] Kaufmann SH. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7: 373.

[302] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364: 2507-16.

[303] Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, Hauschild A, Lorigan P, Wolter P, Long GV, Flaherty K, Nathan P, Ribas A, Martin AM, Sun P, Crist W, Legos J, Rubin SD, Little SM, Schadendorf D. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015;372: 30-9.

[304] Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion-Sileni V, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Swann S, Legos JJ, Jin F, Mookerjee B, Flaherty K. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2015;386: 444-51.

[305] Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Yan Y, Wongchenko M, Chang I, Hsu JJ, Koralek DO, Rooney I, Ribas A, Larkin J. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016;17: 1248-60.

[306] Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol* 2011;5: 124-36.

[307] Lee N, Zakka LR, Mihm MJ, Schatton T. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma

- prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology* 2016;48: 177-87.
- [308] Byrne EH, Fisher DE. Immune and molecular correlates in melanoma treated with immune checkpoint blockade. *Cancer* 2017;123: 2143-2153.
- [309] Weber J. Immunotherapy for melanoma. *Curr Opin Oncol* 2011;23: 163-9.
- [310] Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, White DE, Levy CL, Rosenberg SA, Phan GQ. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18: 2039-47.
- [311] Koller KM, Wang W, Schell TD, Cozza EM, Kokolus KM, Neves RI, Mackley HB, Pameijer C, Leung A, Anderson B, Mallon CA, Robertson G, Drabick JJ. Malignant melanoma-The cradle of anti-neoplastic immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;106: 25-54.
- [312] Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, Waterfield W, Schadendorf D, Smylie M, Guthrie TJ, Grob JJ, Chesney J, Chin K, Chen K, Hoos A, O'Day SJ, Lebbé C. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010;11: 155-64.
- [313] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015;27: 450-61.
- [314] Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015;161: 205-14.
- [315] George DD, Armenio VA, Katz SC. Combinatorial immunotherapy for melanoma. *Cancer Gene Ther* 2017;24: 141-147.
- [316] Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* 2011;86: 981-90.
- [317] Nicholas C, Lesinski GB. Immunomodulatory cytokines as therapeutic agents for melanoma. *Immunotherapy* 2011;3: 673-90.
- [318] Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltrout RH. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7: 1705-21.
- [319] Zhang H, Wang Y, Hwang ES, He YW. Interleukin-10: An Immune-Activating Cytokine in Cancer Immunotherapy. *J Clin Oncol* 2016;34: 3576-3578.
- [320] Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, Iizuka H, Uehara J, Otsuka F, Fujisawa Y, Takenouchi T, Isei T, Iwatsuki K, Uchi H, Ihn H, Minami H, Tahara H. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci* 2017;108: 1022-1031.
- [321] Buder-Bakhaya K, Hassel JC. Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint

Inhibitor Treatment-A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Front Immunol* 2018;9: 1474.

[322] Tarhini AA, Zahoor H, Lin Y, Malhotra U, Sander C, Butterfield LH, Kirkwood JM. Baseline circulating IL-17 predicts toxicity while TGF- β 1 and IL-10 are prognostic of relapse in ipilimumab neoadjuvant therapy of melanoma. *J Immunother Cancer* 2015;3: 39.

[323] Bjoern J, Juul NN, Zeeberg IT, Schmidt H, Fode K, Svane IM. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology* 2016;5: e1100788.

[324] Koguchi Y, Hoen HM, Bambina SA, Rynning MD, Fuerstenberg RK, Curti BD, Urba WJ, Milburn C, Bahjat FR, Korman AJ, Bahjat KS. Serum Immunoregulatory Proteins as Predictors of Overall Survival of Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Cancer Res* 2015;75: 5084-92.

[325] Sanmamed MF, Carranza-Rua O, Alfaro C, Oñate C, Martín-Algarra S, Perez G, Landazuri SF, Gonzalez A, Gross S, Rodriguez I, Muñoz-Calleja C, Rodríguez-Ruiz M, Sangro B, López-Picazo JM, Rizzo M, Mazzolini G, Pascual JI, Andueza MP, Perez-Gracia JL, Melero I. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. *Clin Cancer Res* 2014;20: 5697-707.

[326] Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, Oñate C, Perez G, Alfaro C, Martín-Algarra S, Andueza MP, Gurrpide A, Morgado M, Wang J, Bacchiocchi A, Halaban R, Kluger H, Chen L, Sznol M, Melero I. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28: 1988-1995.

[327] Nonomura Y, Otsuka A, Nakashima C, Seidel JA, Kitoh A, Dainichi T, Nakajima S, Sawada Y, Matsushita S, Aoki M, Takenouchi T, Fujimura T, Hatta N, Koreeda S, Fukushima S, Honda T, Kabashima K. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* 2016;5: e1248327.

[328] Herbst RS, Soria JC, Kowanzetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrín A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515: 563-7.

[329] Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, Alaparthi S, Berman D, Jure-Kunkel M, Siemers NO, Jackson JR, Shahabi V. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61: 1019-31.

[330] Gao J, Shi LZ, Zhao H, Chen J, Xiong L, He Q, Chen T, Roszik J, Bernatchez C, Woodman SE, Chen PL, Hwu P, Allison JP, Futreal A, Wargo JA, Sharma P. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell* 2016;167: 397-404.e9.

- [331] Chen PL, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, Miller JP, Bassett RL, Gopalakrishnan V, Wani K, De Macedo MP, Austin-Breneman JL, Jiang H, Chang Q, Reddy SM, Chen WS, Tetzlaff MT, Broaddus RJ, Davies MA, Gershenwald JE, Haydu L, Lazar AJ, Patel SP, Hwu P, Hwu WJ, Diab A, Glitza IC, Woodman SE, Vence LM, Wistuba II, Amaria RN, Kwong LN, Prieto V, Davis RE, Ma W, Overwijk WW, Sharpe AH, Hu J, Futreal PA, Blando J, Sharma P, Allison JP, Chin L, Wargo JA. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov* 2016;6: 827-37.
- [332] Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, Saco J, Homet MB, Mezzadra R, Chmielowski B, Ruchalski K, Shintaku IP, Sanchez PJ, Puig-Saus C, Cherry G, Seja E, Kong X, Pang J, Berent-Maoz B, Comin-Anduix B, Graeber TG, Tumeh PC, Schumacher TN, Lo RS, Ribas A. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* 2016;375: 819-29.
- [333] Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, Albright A, Cheng JD, Kang SP, Shankaran V, Piha-Paul SA, Yearley J, Seiwert TY, Ribas A, McClanahan TK. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 2017;127: 2930-2940.
- [334] Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep* 2018;45: 2935-2940.
- [335] Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 2006;311: 1924-7.
- [336] Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos RJ, Tortevoeye P, Otroock Z, Taylor G, Gessain A, Harrington W, Panelatti G, Hermine O. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J Clin Oncol* 2010;28: 4177-83.
- [337] Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 7826-31.
- [338] Berger C, Berger M, Hackman RC, Gough M, Elliott C, Jensen MC, Riddell SR. Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood* 2009;114: 2417-26.
- [339] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12: 180-90.
- [340] Brideau-Andersen AD, Huang X, Sun SC, Chen TT, Stark D, Sas IJ, Zadik L, Dawes GN, Guptill DR, McCord R, Govindarajan S, Roy A, Yang S, Gao J, Chen YH, Skartved NJ, Pedersen AK, Lin D, Locher CP, Rebbapragada I, Jensen AD, Bass SH, Nissen TL, Viswanathan S, Foster GR,

Symons JA, Patten PA. Directed evolution of gene-shuffled IFN-alpha molecules with activity profiles tailored for treatment of chronic viral diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 8269-74.

[341] Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL. Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies. *J Intern Med* 2009;266: 141-53.

[342] Amato R. Modest effect of interferon alfa on metastatic renal-cell carcinoma. *Lancet* 1999;353: 6-7.

[343] Floros T, Tarhini AA. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol* 2015;42: 539-48.

[344] Jinushi M, Hodi FS, Dranoff G. Enhancing the clinical activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell vaccines. *Immunol Rev* 2008;222: 287-98.

[345] Mach N, Dranoff G. Cytokine-secreting tumor cell vaccines. *Curr Opin Immunol* 2000;12: 571-5.

[346] Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, Slingluff CJ. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer* 2014;2: 11.

[347] Spitler LE, Weber RW, Allen RE, Meyer J, Cruickshank S, Garbe E, Lin HY, Soong SJ. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, sargramostim) administered for 3 years as adjuvant therapy of stages II(T4), III, and IV melanoma. *J Immunother* 2009;32: 632-7.

[348] Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ, Hwu P. In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res* 2003;63: 9016-22.

[349] Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26: 57-79.

[350] Skak K, Kragh M, Hausman D, Smyth MJ, Sivakumar PV. Interleukin 21: combination strategies for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7: 231-40.

[351] Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989;210: 474-84; discussion 484-5.

[352] Rosenberg SA, Sportès C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, Stetler-Stevenson M, Morton KE, Mavroukakis SA, Morre M, Buffet R, Mackall CL, Gress RE. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother* 2006;29: 313-9.

[353] Dany M, Nganga R, Chidiac A, Hanna E, Matar S, Elston D. Advances in immunotherapy for melanoma management. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12: 2501-2511.

[354] Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int*

2015;2015: 948501.

[355] Engelstein R, Merims S, Eisenberg G, Cohen J, Frank S, Hamburger T, Frankenburg S, Ron I, Isacson R, Grenader T, Steinberg H, Cohen CJ, Peretz T, Lotem M. Immune Monitoring of Patients Treated With a Whole-Cell Melanoma Vaccine Engineered to Express 4-1BBL. *J Immunother* 2016;39: 321-8.

[356] Zeng Q, Li H, Jiang H, Yu J, Wang Y, Ke H, Gong T, Zhang Z, Sun X. Tailoring polymeric hybrid micelles with lymph node targeting ability to improve the potency of cancer vaccines. *Biomaterials* 2017;122: 105-113.

[357] Stark FC, McCluskie MJ, Krishnan L. Homologous Prime-Boost Vaccination with OVA Entrapped in Self-Adjuvanting Archaeosomes Induces High Numbers of OVA-Specific CD8⁺ T Cells that Protect Against Subcutaneous B16-OVA Melanoma. *Vaccines (Basel)* 2016;4.

[358] Dai X, He Y, Yao W, Gao X. Establishment of a spontaneous metastasis tumor model for human ErbB-2 vaccine. *Biomed Pharmacother* 2017;88: 991-998.

[359] Verma V, Kim Y, Lee MC, Lee JT, Cho S, Park IK, Min JJ, Lee JJ, Lee SE, Rhee JH. Activated dendritic cells delivered in tissue compatible biomatrices induce in-situ anti-tumor CTL responses leading to tumor regression. *Oncotarget* 2016;7: 39894-39906.

[360] Calderon-Gonzalez R, Bronchalo-Vicente L, Freire J, Frande-Cabanes E, Alaez-Alvarez L, Gomez-Roman J, Yañez-Diaz S, Alvarez-Dominguez C. Exceptional antineoplastic activity of a dendritic-cell-targeted vaccine loaded with a *Listeria* peptide proposed against metastatic melanoma. *Oncotarget* 2016;7: 16855-65.

[361] Iversen TZ. Immune modulations during chemoimmunotherapy & novel vaccine strategies--in metastatic melanoma and non small-cell lung cancer. *Dan Med J* 2013;60: B4774.

[362] Reed CM, Cresce ND, Mauldin IS, Slingluff CJ, Olson WC. Vaccination with Melanoma Helper Peptides Induces Antibody Responses Associated with Improved Overall Survival. *Clin Cancer Res* 2015;21: 3879-87.

[363] Gutzmer R, Rivoltini L, Levchenko E, Testori A, Utikal J, Ascierto PA, Demidov L, Grob JJ, Ridolfi R, Schadendorf D, Queirolo P, Santoro A, Loquai C, Dreno B, Hauschild A, Schultz E, Lesimple TP, Vanhoutte N, Salaun B, Gillet M, Jarnjak S, De Sousa AP, Louahed J, Brichard VG, Lehmann FF. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open* 2016;1: e000068.

[364] Kumai T, Lee S, Cho HI, Sultan H, Kobayashi H, Harabuchi Y, Celis E. Optimization of Peptide Vaccines to Induce Robust Antitumor CD4 T-cell Responses. *Cancer Immunol Res* 2017;5: 72-83.

[365] Hirvonen M, Capasso C, Guse K, Garofalo M, Vitale A, Ahonen M, Kuryk L, Vähä-Koskela

M, Hemminki A, Fortino V, Greco D, Cerullo V. Expression of DAI by an oncolytic vaccinia virus boosts the immunogenicity of the virus and enhances antitumor immunity. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3: 16002.

[366] Zhang SX. Turning killer into cure -- the story of oncolytic herpes simplex viruses. *Discov Med* 2015;20: 303-9.

[367] Huo M, Zhao Y, Satterlee AB, Wang Y, Xu Y, Huang L. Tumor-targeted delivery of sunitinib base enhances vaccine therapy for advanced melanoma by remodeling the tumor microenvironment. *J Control Release* 2017;245: 81-94.

[368] Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, Bukur V, Tadmor AD, Luxemburger U, Schrörs B, Omokoko T, Vormehr M, Albrecht C, Paruzynski A, Kuhn AN, Buck J, Heesch S, Schreeb KH, Müller F, Ortseifer I, Vogler I, Godehardt E, Attig S, Rae R, Breitkreuz A, Tolliver C, Suchan M, Martic G, Hohberger A, Sorn P, Diekmann J, Ciesla J, Waksman O, Brück AK, Witt M, Zillgen M, Rothermel A, Kasemann B, Langer D, Bolte S, Diken M, Kreiter S, Nemecek R, Gebhardt C, Grabbe S, Höller C, Utikal J, Huber C, Loquai C, Türeci Ö. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017;547: 222-226.

[369] Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, Zhang W, Luoma A, Giobbie-Hurder A, Peter L, Chen C, Olive O, Carter TA, Li S, Lieb DJ, Eisenhaure T, Gjini E, Stevens J, Lane WJ, Javeri I, Nelliappan K, Salazar AM, Daley H, Seaman M, Buchbinder EI, Yoon CH, Harden M, Lennon N, Gabriel S, Rodig SJ, Barouch DH, Aster JC, Getz G, Wucherpfennig K, Neuberg D, Ritz J, Lander ES, Fritsch EF, Hacohen N, Wu CJ. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547: 217-221.

[370] Hellmann MD, Snyder A. Making It Personal: Neoantigen Vaccines in Metastatic Melanoma. *Immunity* 2017;47: 221-223.

[371] Rodríguez-Cerdeira C, Carnero GM, López-Barcenas A, Sánchez-Blanco E, Sánchez-Blanco B, Fabbrocini G, Bardhi B, Sinani A, Guzman RA. Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive Review. *Mediators Inflamm* 2017;2017: 3264217.

[372] Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res* 2019;39: 6-21.

[373] Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 1996;78: 427-32.

[374] Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol* 2018;31: 24-38.

[375] Schadendorf D, van Akkooi A, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, Stang A, Roesch A, Ugurel S. Melanoma. *Lancet* 2018;392: 971-984.

[376] Jobe NP, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, Lacina L, Mateu R, Smetana K, Brábek J.

Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol* 2016;146: 205-17.

[377] Peng HH, Liang S, Henderson AJ, Dong C. Regulation of interleukin-8 expression in melanoma-stimulated neutrophil inflammatory response. *Exp Cell Res* 2007;313: 551-9.

[378] Kuphal S, Wallner S, Bosserhoff AK. Impact of LIF (leukemia inhibitory factor) expression in malignant melanoma. *Exp Mol Pathol* 2013;95: 156-65.

[379] Tobin RP, Jordan KR, Kapoor P, Spongberg E, Davis D, Vorwald VM, Coutts KL, Gao D, Smith DE, Borgers J, Robinson S, Amato C, Gonzalez R, Lewis KD, Robinson WA, Borges VF, McCarter MD. IL-6 and IL-8 Are Linked With Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation and Correlate With Poor Clinical Outcomes in Melanoma Patients. *Front Oncol* 2019;9: 1223.

[380] Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;170: 3369-76.

[381] Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997;151: 1105-13.

[382] Humbert L, Ghozlan M, Canaff L, Tian J, Lebrun JJ. The leukemia inhibitory factor (LIF) and p21 mediate the TGF β tumor suppressive effects in human cutaneous melanoma. *BMC Cancer* 2015;15: 200.

[383] Guo H, Cheng Y, Martinka M, McElwee K. High LIFr expression stimulates melanoma cell migration and is associated with unfavorable prognosis in melanoma. *Oncotarget* 2015;6: 25484-98.

[384] Mangahas CR, Dela CG, Friedman-Jiménez G, Jamal S. Endothelin-1 induces CXCL1 and CXCL8 secretion in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2005;125: 307-11.

[385] Hatano T, Yashiro M, Fujikawa H, Motomura H. C-X-C Motif Ligand 1 (CXCL1) from melanoma cells down-regulates the invasion of their metastatic melanoma cells. *Oncotarget* 2018;9: 31090-31097.

[386] Díaz-Valdés N, Basagoiti M, Dotor J, Aranda F, Monreal I, Riezu-Boj JI, Borrás-Cuesta F, Sarobe P, Feijó E. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 by TGF β 1 in melanoma enhances tumor infiltration and immunosuppression. *Cancer Res* 2011;71: 812-21.

[387] Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingsluff C, McKee M, Gajewski TF. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment. *Cancer Res* 2009;69: 3077-85.

[388] Nesbit M, Schaidler H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol*

2001;166: 6483-90.

[389] Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012;12: 253-68.

[390] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 2009;182: 4499-506.

[391] Vianello F, Papeta N, Chen T, Kraft P, White N, Hart WK, Kircher MF, Swart E, Rhee S, Palù G, Irimia D, Toner M, Weissleder R, Poznansky MC. Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *J Immunol* 2006;176: 2902-14.

[392] Bartolomé RA, Gálvez BG, Longo N, Baleux F, Van Muijen GN, Sánchez-Mateos P, Arroyo AG, Teixidó J. Stromal cell-derived factor-1 α promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* 2004;64: 2534-43.

[393] Terpos E, Politou M, Szydlo R, Goldman JM, Apperley JF, Rahemtulla A. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003;123: 106-9.

[394] Hoh BL, Hosaka K, Downes DP, Nowicki KW, Fernandez CE, Batich CD, Scott EW. Monocyte chemotactic protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway. *Circulation* 2011;124: 2243-52.

[395] Cho WC, Jour G, Aung PP. Role of angiogenesis in melanoma progression: Update on key angiogenic mechanisms and other associated components. *Semin Cancer Biol* 2019;59: 175-186.

[396] Ni CS, Sun BC, Dong XY, Sun T, Zhao N, Liu YR, Gu Q. Promoting melanoma growth and metastasis by enhancing VEGF expression. *Contemp Oncol (Pozn)* 2012;16: 526-31.

[397] Redondo P, Bandrés E, Solano T, Okroujnov I, García-Foncillas J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro. *Cytokine* 2000;12: 374-8.

[398] Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2009;15: 1931-9.

[399] Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7: 504-16.

[400] Della CC, Fasano M, Papaccio F, Ciardiello F, Morgillo F. Role of HGF-MET Signaling in Primary and Acquired Resistance to Targeted Therapies in Cancer. *Biomedicines* 2014;2: 345-358.

[401] Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman

J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012;487: 505-9.

[402] Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist* 2015;20: 660-73.

[403] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23: 1011-27.

[404] Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005;201: 1089-99.

[405] Cao Y, Cao R, Hedlund EM. Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med (Berl)* 2008;86: 785-9.

[406] Hasumi Y, Kłosowska-Wardega A, Furuhashi M, Ostman A, Heldin CH, Hellberg C. Identification of a subset of pericytes that respond to combination therapy targeting PDGF and VEGF signaling. *Int J Cancer* 2007;121: 2606-14.

[407] Emmett MS, Dewing D, Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. *Am J Cancer Res* 2011;1: 852-68.

[408] Liu M, Xing LQ. Basic fibroblast growth factor as a potential biomarker for diagnosing malignant tumor metastasis in women. *Oncol Lett* 2017;14: 1561-1567.

[409] Bosserhoff AK, Schneider N, Ellmann L, Heinzerling L, Kuphal S. The neurotrophin Neuritin1 (cpg15) is involved in melanoma migration, attachment independent growth, and vascular mimicry. *Oncotarget* 2017;8: 1117-1131.

[410] Komatsu N, Waki M, Sue M, Tokuda C, Kasaoka T, Nakajima M, Higashi N, Irimura T. Heparanase expression in B16 melanoma cells and peripheral blood neutrophils before and after extravasation detected by novel anti-mouse heparanase monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 2008;331: 82-93.

[411] Marchetti D, Denkins Y, Reiland J, Greiter-Wilke A, Galjour J, Murry B, Blust J, Roy M. Brain-metastatic melanoma: a neurotrophic perspective. *Pathol Oncol Res* 2003;9: 147-58.

[412] Xiao R, Bergin SM, Huang W, Slater AM, Liu X, Judd RT, Lin ED, Widstrom KJ, Scoville SD, Yu J, Caligiuri MA, Cao L. Environmental and Genetic Activation of Hypothalamic BDNF Modulates T-cell Immunity to Exert an Anticancer Phenotype. *Cancer Immunol Res* 2016;4: 488-497.

[413] Liu X, McMurphy T, Xiao R, Slater A, Huang W, Cao L. Hypothalamic gene transfer of BDNF inhibits breast cancer progression and metastasis in middle age obese mice. *Mol Ther* 2014;22: 1275-1284.

[414] Jiang H, Gebhardt C, Umansky L, Beckhove P, Schulze TJ, Utikal J, Umansky V. Elevated

chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int J Cancer* 2015;136: 2352-60.

[415] Nagarkatti-Gude N, Bronkhorst IH, van Duinen SG, Luyten GP, Jager MJ. Cytokines and chemokines in the vitreous fluid of eyes with uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53: 6748-55.

[416] Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, Gorelik E, Lokshin AE. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res* 2007;13: 2422-8.

[417] Sim GC, Radvanyi L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25: 377-90.

[418] Han F, Hu R, Su M, Yu Y, Yang H, Lai L. A human recombinant IL-7/HGFbeta hybrid cytokine enhances antitumor immunity in mice. *Am J Cancer Res* 2017;7: 1714-1723.

[419] Song Y, Liu Y, Hu R, Su M, Rood D, Lai L. In Vivo Antitumor Activity of a Recombinant IL7/IL15 Hybrid Cytokine in Mice. In; 2016. p. 2413-2421.