

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Avanços Terapêuticos no Melanoma Maligno Metastático

Joana Guerreiro Serrudo

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Paula Francisco, Professora
Auxiliar.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Avanços Terapêuticos no Melanoma Maligno Metastático

Joana Guerreiro Serrudo

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia.**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Paula Francisco, Professora
Auxiliar.

2021

Resumo

O melanoma, apesar de apenas corresponder a cerca de 5% dos cânceros da pele, é responsável por 90% das mortes provocadas por este tipo de cancro. A alta mortalidade associada ao melanoma maligno metastático pode ter como principal causa o diagnóstico tardio, que na maioria dos casos é feito no estadio IV, no qual já existe presença de metástases à distância. O melanoma maligno metastático, se diagnosticado precocemente, nos estádios I a III, pode ser facilmente tratável, através de remoção cirúrgica eficaz. Em estádios mais avançados, o prognóstico dos doentes é mau, associado a taxas de mortalidade muito elevadas.

Durante muitos anos, a única opção terapêutica disponível para doentes com melanoma em estadio avançado era a utilização da combinação de dacarbazina, um agente alquilante aprovado em 1974, com interleucina-2. Mais de 1500 estudos comprovaram que esta opção terapêutica não garantia um aumento na taxa de sobrevivência ou qualquer benefício para os doentes. A ineficácia desta opção deve-se em grande parte aos mecanismos de resistência intrínseca, desenvolvidos pelas células malignas de melanoma.

Com o aumento dos conhecimentos moleculares, ocorreram avanços significativos e foram descobertos novos alvos terapêuticos passíveis de serem utilizados como opções terapêuticas viáveis, revolucionando a terapêutica do melanoma maligno metastático. A utilização de imunoterapia com anticorpos monoclonais possibilitou um novo horizonte no tratamento do melanoma maligno, permitindo melhores taxas de sobrevivência e de sobrevivência, mostrando-se mais eficaz do que a quimioterapia. Vários fármacos foram aprovados pela FDA com indicação na terapêutica do melanoma maligno metastático, sendo o primeiro, em 2011, o ipilimumab (anti CTLA-4), seguido do nivolumab e do pembrolizumab (ambos anti PD-1), em 2014.

Devido à descoberta de mutações em determinados genes como o gene BRAF, presente numa grande percentagem dos indivíduos, foi possível desenvolver terapêuticas direcionadas como o vemurafenib, dabrafenib ou encorafenib e binimetinib.

A descoberta de novas opções terapêuticas, juntamente com os avanços na deteção precoce, o avanço tecnológico das técnicas e dados da biópsia dos nódulos linfáticos e a atualização do estadiamento do melanoma em 2009, alteraram o paradigma do melanoma maligno metastático. O presente trabalho faz uma revisão das opções terapêuticas inovadoras que foram aprovadas desde 2010.

Palavras-chave: Melanoma maligno metastático, imunoterapia, terapêutica direcionada, CTLA-4, PD-1

Abstract

The melanoma, although it corresponds only to about 5% of skin cancers, is responsible for 90% of deaths caused by this type of cancer. The late diagnosis may be the main cause to the high mortality associated with metastatic malignant melanoma, which in most cases occurs in stage IV, in which distant metastases are already present. Metastatic malignant melanoma, if diagnosed early, in stages I to III, can be easily treated, through effective surgical resection. In more advanced stages, the prognosis of patients is poor, associated with very high mortality rates.

For many years, the only therapeutic option available to patients with advanced stage melanoma was the combination of dacarbazine, an alkylating agent approved in 1974, with interleukin-2. More than 1500 studies have shown that this therapeutic option does not guarantee an increase in the survival rate or any benefit for patients. The ineffectiveness of this option is largely due to the characteristic resistance mechanisms, developed by melanoma malignant cells.

With the increase in molecular knowledge, significant advances have occurred and new possible therapeutic targets that could be used as viable therapeutic options have been discovered, revolutionizing the treatment of metastatic malignant melanoma. The use of immunotherapy with monoclonal antibodies has enabled a new horizon in the treatment of malignant melanoma, allowing better survival rates, proving to be more effective than chemotherapy. Several drugs were approved by the FDA with indication for the treatment of metastatic malignant melanoma, the first being, in 2011, ipilimumab (anti CTLA-4), followed by nivolumab and pembrolizumab (both anti PD-1), in 2015.

Due to the discovery of mutations in certain genes such as the BRAF gene, present in a large percentage of individuals, it was possible to develop targeted therapies such as vemurafenib, dabrafenib or encorafenib and binimetinib.

The discovery of new therapeutic options, together with advances in early detection, the updating of lymph node biopsy techniques and data and the updating of melanoma staging in 2009, changed the metastatic malignant melanoma paradigm. The presente work is a review of the innovative therapeutic options that have been approved since 2010.

Keywords: metastatic melanoma, immunotherapy, target therapy, CTLA-4, PD-1

Agradecimentos

Terminada a presente monografia, não podia deixar de fazer os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Ana Paula Francisco, pela sua orientação e total disponibilidade, que foram essenciais para a realização desta monografia.

Aos meus pais, por todo o amor, dedicação e valores que me transmitiram, não só nestes 5 anos, mas toda a vida. Obrigada por me mostrarem que sou capaz, por acreditarem em mim e me incentivarem a querer ser mais e melhor. Adoro-vos!

À minha irmã, Ana Rita, por seres, primeiro que tudo, um exemplo para mim. Obrigada por todo o amor, toda a paciência e por seres quem és. Obrigada por todos os conselhos e palavras. Nunca poderei agradecer tudo o que fazes por mim.

Ao Pedro, por seres quem és e por me inspirares todos os dias. Agradeço-te todo o amor e carinho que me transmites. És o meu porto seguro.

À minha tia Mila, Andreia e avós, por estarem sempre presentes e serem tão importantes para mim.

Às minhas amigas, Ana, Cristiana, Jéssica, Joana, Mariana e Rita, por serem os meus pilares durante estes 5 anos. Tornaram estes anos inesquecíveis e não vos podia agradecer mais por tudo o que são. Não teria sido o mesmo sem vocês. São incríveis!

Aos amigos, Ana, Maria, Inês, Margarida, Bentes, Joana, Pedro, Gonçalo, por terem acompanhado todo o meu crescimento. Obrigada por me darem força e por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava. Obrigada pela vossa amizade incomparável.

Agradeço a quem ficaria radiante por me ver finalizar esta etapa se estivessem presentes. Aos meus avós, por serem uma luz, sei que ficariam orgulhosos. Esta conquista também é vossa.

Finalmente, agradeço à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela casa que foi durante estes anos. Obrigada pelo espírito que transmitem e por não permitirem que ninguém se sinta sozinho desde o primeiro dia.

Abreviaturas

ACI	<i>Adoptive Cell Immunotherapy</i>
ALM	<i>Acral lentiginous melanoma</i>
CTLA-4	Antigénio 4 dos linfócitos T citotóxicos
DM	<i>Desmoplastic melanoma</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
IFN	Interferão
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IFN γ	Interferão γ
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos
GSH	Glutationa
GST	Enzima glutationa-S-transferase
LDH	Lactato desidrogenase
LMM	<i>Lentigo maligna melanoma</i>
MAPK	Proteína quinase ativada pelo mitogénio
MM	Melanoma metastático
MMM	Melanoma maligno metastático
NNM	<i>Nodular melanoma</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Sobrevivência geral
RCM	<i>Reflectance confocal microscopy</i>
RGP	Fase de crescimento radial
SSM	<i>Spreading melanoma</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TVEC	Talimogene laherparepvec
UV	Ultravioleta
VGP	Fase de crescimento vertical

Índice

1. Introdução	1
a. Melanoma maligno metastático	1
b. Fatores de risco	5
c. Diagnóstico	6
d. Epidemiologia	8
e. Prognóstico	10
2. Objetivos	12
3. Materiais e métodos	12
4. Cirurgia	13
5. Quimioterapia	15
6. Mecanismos de resistência à quimioterapia	16
7. Terapêuticas avançadas	18
a. Imunoterapia	19
i. Interleucina 2	20
ii. Inibidores da CTL4	20
iii. Inibidores da PD1	22
b. Terapêuticas direcionadas	26
i. Inibidores BRAF	26
c. Adoptive Cell Immunotherapy	30
d. Terapêuticas combinadas	31
8. Perspetivas Futuras	33
9. Conclusões	34
10. Referências bibliográficas	36

Índice de Figuras

Fig. 1 – Melanoma extensivo superficial

Fig. 2 – Melanoma Nodular

Fig. 3 – Lentigo Maligno Melanoma

Fig. 4 – Estadiamento do melanoma maligno metastático

Fig. 5 - ABCDE do melanoma. Mnemónica que auxilia profissionais e doentes na identificação de lesões possivelmente melanocíticas.

Fig. 6 - Taxa de incidência de melanoma padronizada por idade em todo o mundo para 2018.

Fig. 7 - Classificação por critérios TMN e por estadio anatómico para melanoma cutâneo.

Fig. 8 – Estrutura do fármaco dacarbazina

Fig. 9 – Cronologia da aprovação de fármacos para o tratamento do melanoma maligno metastático pela *Food and Drug Administration*.

Fig. 10 – Mecanismo de ação do anticorpo anti-CTLA4.

Fig. 11 – Mecanismo de ação do anticorpo anti-PD1.

Fig. 12 – Protocolo do método *adoptive cell immunotherapy*

1. Introdução

A incidência de cancro tem aumentado mundialmente. O carcinoma cutâneo, mais conhecido por cancro da pele, é um problema de saúde pública global preeminente, sendo um dos tipos de cancro mais comuns. (1) Este atinge qualquer etnia, idade, classe socioeconómica ou região geográfica. De entre todos os vários tipos de cancro de pele que existem, apenas cerca de 2% são classificados como melanoma maligno (MM), mas este é o responsável pelo maior número de óbitos por cancro da pele. Em 2018, apenas na Europa, houve cerca de 3.9 milhões de novos casos de qualquer tipo de cancro e 1.93 milhões de mortes. Entre estes, 3,7% dos casos foram associados ao melanoma maligno, responsável por cerca de 27 mil mortes naquele ano. (2,3) Nos últimos anos, avanços relevantes ocorreram no campo da terapêutica do melanoma maligno, com a aprovação de vários fármacos, principalmente no campo da imunoterapia (como anticorpos anti-CTLA4 ou anti-PD1) ou inibidores BRAF, capazes de reverter o mau prognóstico associado ao diagnóstico de melanoma maligno.

a) Melanoma Maligno Metastático

Existem três tipos de cancro da pele. A maioria dos cancros da pele cutâneos tem origem em células epiteliais queratinizadas, incluindo o carcinoma baso-celular, carcinoma espinocelular. (4) O melanoma maligno é um tumor maligno que surge nos melanócitos. Dentro do cancro da pele, é o mais mortífero, causando cerca de 55.500 mortes anualmente, representando um enorme encargo para a saúde pública mundial. (5–7) O MM tem, possivelmente, origem numa série de mutações em genes regulatórios, essenciais no controlo da proliferação celular e na produção de fatores de crescimento nos melanócitos. A exposição à luz ultravioleta (UV) causa mutações genéticas que ativam oncogenes, inativam genes supressores de tumor e dificultam a reparação do ADN. Este processo pode causar proliferação descontrolada de melanócitos culminando no MM. (4,8) Estas células produzem melanina, um pigmento produzido e depositado no melanosoma, que está associado a uma ampla gama de coloração da pele, cabelo, olhos e algumas áreas do sistema nervoso. (8–10) Na pele, os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos, conferindo um nível de proteção contra a radiação UV, reduzindo os danos causados como o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogénese. (8,10)

Pelo facto de a localização maioritária dos melanócitos ser a camada basal da epiderme, o melanoma é mais frequentemente encontrado na pele. Ainda assim, pode surgir na cavidade oral, na mucosa gastrointestinal superior, mucosa genital, trato uveal do olho e nas leptomeninges. (11)

Clinicamente, a aparência do melanoma é variável. (12) A mais típica lesão do melanoma cutâneo é uma mácula/nódulo assimétrico com os bordos irregulares e com coloração variada dentro da lesão. Na avaliação histológica, é possível detetar ninhos de melanócitos na epiderme com tamanho, forma, espaçamento variável e que apresentam propagação pagetóide ou confluência focal. Apesar da maioria das apresentações do melanoma serem pigmentadas, também se pode apresentar como lesões avermelhadas. (11)

O melanoma é comumente classificado pelo local de apresentação, especificamente cutâneo ou não cutâneo, sendo que o melanoma cutâneo corresponde a 91,2% de todos os melanomas. (13,14) Tendo em consideração as características clínicas e histológicas, o MM pode ser classificado em 3 subtipos: melanoma extensivo superficial (SSM), melanoma nodular (NNM) e lentigo maligno melanoma (LMM). Ainda assim, devido à alta heterogeneidade associada ao MM, nem sempre é fácil proceder à sua classificação. (15,16)

O subtipo mais comum de melanoma é o SSM (Fig.1), responsável por 70% dos casos, e pode surgir espontaneamente ou a partir de um nevo, comumente chamado de sinal. (15) A lesão pode apresentar-se numa variedade de cores desde castanho a azulado e tem, por norma, margens bem delimitadas, com uma ou mais protrusões irregulares. A superfície pode ter uma pápula palpável ou um nódulo que se estende alguns milímetros acima da superfície da pele. (16) É mais frequente na parte anterior da perna na mulher ou nas costas no homem e encontra-se relacionado com a exposição intermitente ao sol. (17)



Fig. 1 – Melanoma extensivo superficial (Disponível em <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9186>)

Correspondendo a cerca de 14-30% dos melanomas, o NNM ocorre frequentemente no tronco e membros em pessoas entre os 50-60 anos, sendo mais comum no homem. (15,18,19) O NNM apresenta-se frequentemente ulcerado e como apenas apresenta uma fase de crescimento vertical está associado a um crescimento mais rápido e a uma maior taxa de metástases. (15) Clinicamente, NMM tem uma cor uniforme castanha, preta ou preto-azulada e pode apresentar-se como um nódulo de superfície lisa, como um pólipo ulcerado ou como uma placa elevada com contornos irregulares. (16)



Fig. 2 – Melanoma Nodular (Disponível em Rathi VK, Williams RB, Yamrozik J, et al. Cardiovascularmagnetic resonance of the charcoal heart. J Cardiovasc Magn Reson 2008;10:37)

LMM é responsável por 4-15% dos melanomas cutâneos e correlaciona-se com a exposição solar de longo prazo e o aumento da idade. Histologicamente, é caracterizado pela proliferação de células da camada basal da epiderme e pode evoluir por décadas antes de invadir a derme papilar. (15,16) Está localizado principalmente no pescoço e na cabeça. (20)



Fig. 3 - Lentigo maligno melanoma (Disponível em Tsatsou F, Trakatelli M, Patsatsi A, et al. Extrinsic aging:UV-mediated skin carcinogenesis. Dermatoendocrinol 2012;4(3):295)

Para além destes, existem subtipos mais raros de melanoma como o melanoma acral lentiginoso (ALM), correspondente a 5% dos MM. É o mais comum em asiáticos, hispânicos e africanos, sendo mais comum em mulheres idosas. É frequente em pele glabra e em pele adjacente dos dedos, palma das mãos e planta dos pés, podendo ocorrer no leito ungueal do dedo do pé ou polegar. Outro subtipo raro é o melanoma desmoplásico (DM), frequente na zona da cabeça e pescoço em doentes, entre os 60 e 70 anos, sendo mais comum no homem.

Pode aparecer ainda em zonas mucosas como a gengiva ou a genitália. Está associado a uma alta taxa de recorrência, pelo seu crescimento altamente invasivo e a sua elevada infiltração neural. Apesar da alta recorrência, raramente metastiza para os nódulos linfáticos, sendo mais propenso a metastizar para os pulmões. (15,16)

A progressão do MM está dividida em 5 estágios. (Fig. 4) No melanoma *in situ* (estágio 0), este encontra-se localizado como um nevo e limitado à epiderme, não existindo interação considerável com vasos sanguíneos. A maioria destes nevos cutâneos são benignos, mas os melanócitos facilmente progridem para fase I, fase de crescimento radial (RGP), originando invasão dos tecidos e lesões intra epidérmicas. No estágio II, o tumor atinge uma fase de crescimento vertical (VGP). Nesta fase, há um aumento do risco de doença metastática pela invasão da derme altamente vascularizada. Nestas condições, o melanoma primário ainda pode ser removido por excisão cirúrgica radical, com uma alta taxa de efetividade, garantindo a prevenção da propagação da doença metastática. No estágio III, ocorre propagação das células para os nódulos linfáticos regionais e a formação de metástases locais. Por fim, o estágio IV é marcado pela detecção de metástases à distância. (8)

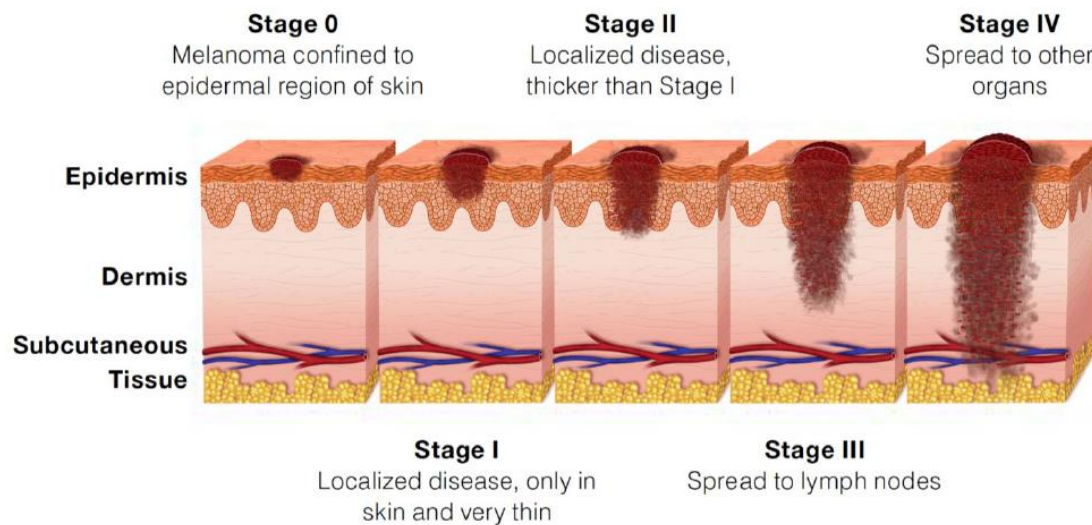


Fig. 4 – Estadiamento do melanoma maligno metastático (disponível em The Journey Through Stage III Melanoma: A Guide for Patients - CONQUER: the patient voice (conquer-magazine.com))

A primeira evidência da progressão da doença são as metástases cutâneas, que ocorrem em mais de 50% dos doentes. Destas, cerca de 30% envolvem os nódulos linfáticos, 3% têm envolvimento visceral e 12% ambos. (12) Por norma, as metástases do melanoma são nódulos bem circunscritos, não encapsulados, localizados na derme ou tecido subcutâneo. (12) A presença de uma lesão homogênea, sacular e vascularizada, com um halo pigmentado e manchas circundantes acinzentadas sugerem a presença de uma metástase de MM. (21) Entre os doentes com metástases cutâneas de qualquer tipo, nos homens o MM é a doença maligna primária mais frequente e nas mulheres é a segunda mais frequente. (12)

A maior parte dos diagnósticos ocorre no estadiamento de disseminação metastática e não nos estadiamentos iniciais (estadiamentos I-III), piorando exponencialmente o prognóstico. A probabilidade

de disseminação metastática depende de vários fatores como a espessura do tumor, a presença ou ausência de ulceração, localização anatômica e apresentação clínica. Ainda assim, o aparecimento do melanoma avançado ou recorrente pode resultar de uma cirurgia ineficaz, e de aspetos intrínsecos da doença, como a neovascularização, um fator crucial na progressão do melanoma. (21,22) Os vasos sanguíneos neoformados facilitam a migração das células tumorais da lesão primária, enquanto os depósitos de matriz extracelular associados aos novos canais vasculares fornecem um esqueleto para o tumor, favorecendo o seu crescimento e a disseminação metastática. (21)

Os órgãos mais frequentemente metastizado são a pele (42-57%), os pulmões (18-36%), o fígado (14-20%), o cérebro (12-20%) e a medula espinhal. (8) Nas metástases cutâneas, os locais anatómicos mais frequentes são os membros inferiores, couro cabeludo, braços, rosto e pés. (23)

As metástases cutâneas de MM podem ser diagnosticadas e diferenciadas (clinicamente e histologicamente) de outras patologias cancerígenas, incluindo o melanoma maligno primário, carcinoma basocelular pigmentado, carcinoma cutâneo de células claras e fibroxantoma atípico. (12,23) Distinguir metástases de mimetizadores benignos é essencial para determinar o prognóstico e o tratamento adequado ao estágio. (23)

Assim, os doentes diagnosticados são aconselhados a ter acompanhamento próximo com exame da pele de todo o corpo e de nódulos linfáticos. (24) É de extrema relevância que os clínicos avaliem cuidadosamente quaisquer novas lesões cutâneas em doentes com histórico de melanoma e que tenham pouca relevância para pedido de biópsia. (25)

b) Fatores de Risco

Vários fatores de risco já foram associados ao MM. Considerada uma doença com origem multifatorial, o melanoma pode depender da suscetibilidade genética e da exposição ambiental. A principal forma de exposição ambiental é a exposição à radiação UV, que embora modificável e controlável, é o principal fator de risco associado ao melanoma, devido ao seu efeito genotóxico. (16) Inúmeros estudos estabeleceram uma ligação inequívoca entre a ocorrência de melanoma e a exposição intermitente ao sol, concluindo que é um fator de risco determinante. (26) Um historial de queimaduras solares, associado à sobre-exposição intermitente ao sol, principalmente na infância, parece estar associado a um maior risco de MM. (27)

A exposição à radiação UV artificial nos solários também pode ser determinante no desenvolvimento do melanoma, já que é significativamente maior do que a exposição diária normal à radiação UV. (28) Uma atualização pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro em 2009 incluiu a radiação ultravioleta dos solários como cancerígena. (29) Estima-se que cerca de 6.000 casos de MM todos os anos sejam causados por uso de solário nos EUA. Um início da prática numa idade mais precoce e a maior duração da utilização aumenta o risco de desenvolvimento de MM. Qualquer experiência de solário está associada a um risco 16% a 20% maior de desenvolvimento de melanoma em comparação com aqueles que nunca foram expostos a solário. (13,30) Com base num estudo efetuado em 61 milhões de crianças

com idade igual ou inferior a 14 anos, Guy *et al.* estimaram que cerca de 62 mil casos de MM e mais de 6.500 mortes poderiam ter sido evitadas se houvesse legislação que interditasse menores à utilização de solário, diminuindo assim a despesa com o diagnóstico e tratamento do MM em mais de 340 milhões de dólares, apenas nos EUA. (31)

Outros fatores de risco *major* são o número de nevos melanocíticos, a história familiar e predisposição genética. (16) Mais de 25% dos melanomas ocorrem juntamente com nevos pré-existentes. (32) Indivíduos com mais de 100 nevos têm um risco 7 vezes superior de ter melanoma. (33) A presença de um único nevo com características atípicas aumenta o risco de melanoma. (16) O histórico familiar de melanoma é um fator de risco considerável, pela possível hereditariedade do MM. (16) Indivíduos com história familiar de melanoma têm um risco relativo 2,2 vezes superior para desenvolver MM em comparação com indivíduos sem história familiar de melanoma. (34) É essencial a identificação precoce de indivíduos com risco elevado de MM, garantindo uma ação preventiva eficaz. (7) Pacientes com uma predisposição genética subjacente para desenvolver melanoma geralmente apresentam ocorrência em idade inferior a 40 anos, múltiplos melanomas primários ou uma história de lesões precursoras, como nevos displásicos e são mais propensos a ter tumores que são superficialmente invasivos, apresentando um melhor prognóstico. (16,35,36)

Certas características fenotípicas como cabelos ruivos, pele clara, sardas, olhos claros, sensibilidade ao sol e incapacidade de bronzear aumentam o risco de desenvolver MM em aproximadamente 50%. (37) Foi verificada a existência de uma relação inversamente proporcional entre a ocorrência de cancro da pele e a cor da pele. Indivíduos com pele mais clara têm 13% mais probabilidade de desenvolver MM do que indivíduos com pele mais escura. (10)

Doentes com sistema imunológico debilitado apresentam um risco aumentado de desenvolver cancro da pele. (13) Doentes que realizaram transplante de órgãos apresentam um risco 2,7 vezes superior de desenvolver MM. (38) Alguns imunossuppressores, como a ciclosporina e o sirolimus, têm sido associados ao aumento da incidência de melanoma. (39)

c) Diagnóstico

Antes da década de 80, os melanomas eram frequentemente diagnosticados pela identificação clínica de características macroscópicas: lesões em estágio avançado, grandes, ulceradas e com fungos. (16) Quando o melanoma se desenvolve num local de difícil visualização ou se for não cutâneo, tem mais probabilidade de ser diagnosticado num estágio mais avançado. Certos padrões de distribuição do melanoma estão relacionados com os padrões de exposição ao sol e histórico de queimaduras solares. (13)

A deteção precoce do MM é um fator determinante na redução da mortalidade. Atualmente, a idade média de diagnóstico é de 57 anos. Devido ao elevado potencial do melanoma para metastizar, é essencial não só identificar fatores de risco e utilizar terapêuticas eficazes, mas desenvolver métodos de diagnóstico precoces. (13,16) O diagnóstico de melanoma, devido à heterogeneidade das lesões, pode ser difícil. O MM cutâneo pode mimetizar lesões benignas, incluindo nevos, nevos azuis, dermatofibromas e hemangiomas, atrasando o diagnóstico

correto. (12) A lesão tem que ser reconhecida como clinicamente atípica e sujeita a biopsia por um profissional de saúde, onde é submetida a uma análise microscópica para reconhecer características histopatológicas clássicas. Ainda assim, o melanoma tem variantes histológicas que não são facilmente reconhecíveis pelo exame tradicional de hematoxilina e eosina (H&E). (5,40)

Grande parte dos melanomas são detetados pelo próprio doente. (41) O autoexame da pele tem um grande potencial, já que é um método simples e adequado de rastreamento de melanoma e lesões pré-cancerosas. Assim, um esforço considerável tem sido direcionado para aumentar a eficácia e a prática do autoexame da pele através da educação do doente (41). Em 1985 foi criada a mnemónica ABCD, que significa Assimetria, Bordos irregulares, diversidade na Coloração e Diâmetro superior a 6 mm. Posteriormente, foi adicionada a letra E para Evolução, que é importante no diagnóstico de melanomas nodulares. (Fig. 4) A sensibilidade dos critérios foi acima de 55% para todos os parâmetros, atingindo até 90% num dos critérios. Esta ferramenta é um auxílio importante para a deteção da lesão e para um diagnóstico precoce, tanto para os doentes como para profissionais de saúde. (13,16,42–44)

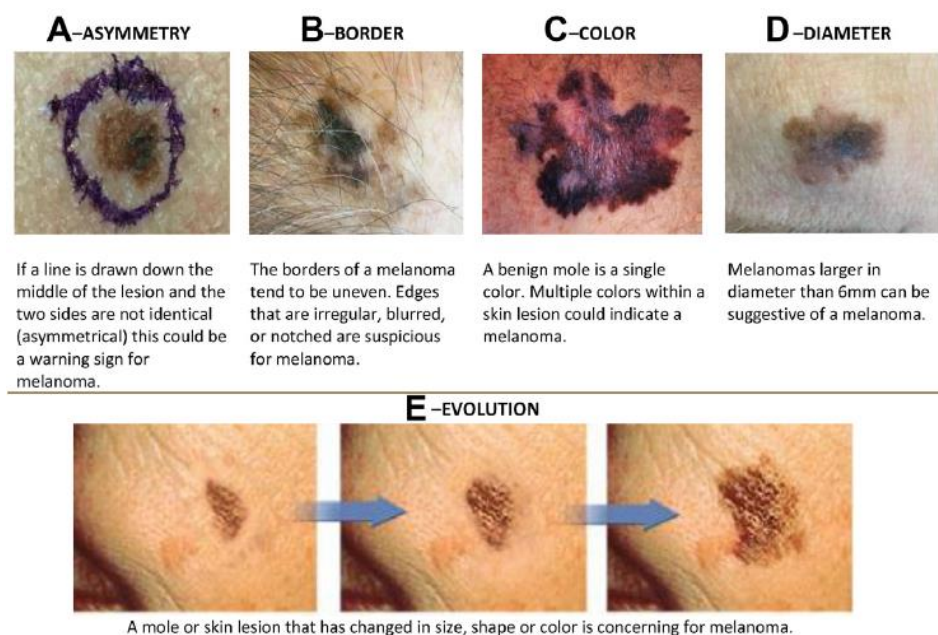


Fig. 5 – ABCDE do melanoma. Mnemónica que auxilia profissionais e doentes na identificação de lesões possivelmente melanocíticas. (Disponível em: Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. Surg Clin North Am [Internet]. 2020;100(1):1–12.)

A lista de Glasgow foi criada como outra ferramenta de diagnóstico precoce, mas é menos utilizada devido à sua sofisticação. É constituída por 7 pontos: 3 *major* (alteração no tamanho, forma e cor) e 4 *minor* (alteração sensorial, diâmetro ≥ 7 mm, presença de inflamação e formação de crostas/sangramento). (16,45)

No diagnóstico do MM, vários dispositivos óticos auxiliares tornaram-se essenciais. Estes incluem dispositivos portáteis de alta resolução que foram designados como dermatoscópios ou microscópios epiluminescentes. A dermatoscopia é uma técnica diagnóstica não invasiva

para observação *in vivo* da pele. Este dispositivo utiliza ampliação ótica para visualização de estruturas morfológicas não visíveis a olho nu. A dermatoscopia aumentou a precisão da detecção do melanoma, uma vez que esta abordagem torna visíveis os primeiros sinais da doença nas lesões pigmentadas muito antes das alterações clínicas. (15,16)

Embora não seja utilizada rotineiramente, a microscopia confocal de refletância (RCM) demonstrou ser uma ferramenta de imagem valiosa no diagnóstico de lesões melanocíticas malignas. O RCM é um exame não invasivo da pele em tempo real com uma resolução quase histológica. O RCM revela alterações cutâneas a nível celular. Algumas das principais vantagens desta ferramenta de imagem não invasiva são: melhoria da precisão, melhor avaliação da correlação dermatoscópico-histológica, seleção do lado da biópsia *in vivo*, avaliação da margem cirúrgica e controlo da resposta de terapêuticas conservadoras. Estudos efetuados provaram uma sensibilidade e especificidade de 90 e 86%, respetivamente. (16,46)

O custo associado ao diagnóstico de MM é substancialmente superior ao de outros cancros da pele. O custo médio por melanoma diagnosticado nos EUA é de 32.594\$ em comparação com 2.498\$ de outros cancros da pele. Esta diferença é facilmente atribuível ao custo da biópsia e estadiamento, exames de imagem e imunoterapias no melanoma avançado. Assim, o diagnóstico precoce tem uma importância a nível económico. (13,24)

d) Epidemiologia

Enquanto se verifica uma diminuição da incidência de vários tipos de tumor, o contrário acontece com o melanoma, principalmente nos EUA, Europa e outros países com população maioritariamente caucasiana. (Fig. 5) (13,47) Entre 1990 e 2010, a incidência do melanoma aumentou cerca de 3% por ano. (48) Em 2019, cerca de 96.500 pessoas foram diagnosticadas com melanoma e cerca de 7.200 morreram desta doença, nos Estados Unidos da América (EUA) e estima-se que houve cerca de 288.000 novos diagnósticos e 60.000 mortes mundialmente. (49,50) Anualmente, há cerca de 130.000 novos casos relatados mundialmente, estimando-se que, em algumas populações, o risco de MM é de 1/50. Apesar do MM corresponder apenas a 5% dos cancros da pele, é responsável por 90% das mortes. (8,51)

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, melanoma of skin, both sexes, all ages

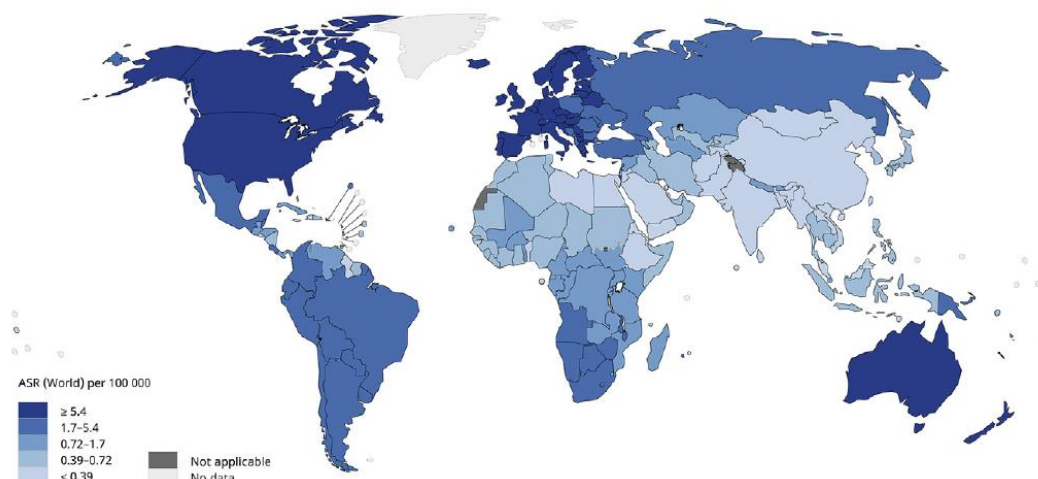


Fig. 6 - Taxa de incidência de melanoma padronizada por idade em todo o mundo para 2018. (Disponível em: Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. Surg Clin North Am [Internet]. 2020;100(1):1–12. Available: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>)

Ao contrário de outros tumores sólidos, o MM afeta principalmente jovens e indivíduos de meia-idade. Constatou-se que, segundo a idade, a incidência aumenta linearmente dos 25 até aos 50 anos, diminuindo depois, principalmente no sexo feminino. (16) Quanto ao sexo, a incidência do MM é questionável. Segundo Markovic et al., o sexo masculino tem aproximadamente 1,5 mais probabilidade de desenvolver MM do que o sexo feminino, enquanto outros estudos referem que a incidência tem que ser analisada juntamente com a idade. Assim, até aos 40 anos, a incidência é maior nas mulheres, enquanto aos 75 anos, a incidência é quase 3 vezes superior para os homens. (7,16,47) A raça também tem influência na incidência do melanoma, com um risco de 2,6% para indivíduos caucasianos, 0,1% para afro-americanos e 0,58% para hispânicos. (13)

A incidência de MM varia dentro da Europa, sendo mais elevada nos países de Norte, em comparação com os de Sul. Isto, provavelmente, justifica-se pelo aumento da proteção contra os raios UV conferida pela pele altamente pigmentada (típica das pessoas do sul da Europa), mas também pode ser devida ao padrão diferente de sol (crónico em vez de intermitente). Apesar disto, estudos recentes demonstrou um aumento da incidência nos países de Sul. (47,52)

Em Portugal, os dados mais recentes revelam 265 óbitos por cancro de pele em 2019 num total de 29176, sendo a idade média de diagnóstico de 69,8 anos. Este número representa cerca de 0,9% do total de óbitos por tumor maligno e 0,2% do total de óbitos em 2019, que foi ligeiramente superior no homem do que na mulher. (53) Com o aumento da incidência de MM mundialmente, este torna-se um problema socioeconómico. (16)

e) Prognóstico

Segundo Rigel et al., entre 2003 e 2007, a idade média de morte por MM foi 68 anos. A taxa de mortalidade é superior para os homens em comparação com as mulheres com a mesma idade. (7)

A classificação do melanoma segundo a *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* é útil para prever o prognóstico dos doentes. A classificação, atualizada em 2009, é baseada em 3 critérios, TMN. (Fig. 6 e 7) O T está associado à espessura do tumor, taxa mitótica tumoral e à presença de ulceração; o N está associado às metástases nos nódulos linfáticos locais; o M relaciona-se com as metástases à distância e a sua localização, bem como com o nível da enzima lactato desidrogenase (LDH). (Fig. 6) (54)

Classification	Thickness (mm)	Ulceration Status/Mitoses	Clinical Staging*			Pathologic Staging†				
			T	N	M	T	N	M		
T										
Tis	NA	NA	0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
T1	≤ 1.00	a: Without ulceration and mitosis < 1/mm ² b: With ulceration or mitoses ≥ 1/mm ²	IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
			IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
T2	1.01-2.00	a: Without ulceration b: With ulceration		T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
			IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
T3	2.01-4.00	a: Without ulceration b: With ulceration		T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
			IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
T4	> 4.00	a: Without ulceration b: With ulceration		T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
			IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
N	No. of Metastatic Nodes	Nodal Metastatic Burden	III	Any T	N > N0	M0	III	Any T	N1a	M0
N0	0	NA					III	T1-4a	N2a	M0
N1	1	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†					III	T1-4b	N1a	M0
							III	T1-4b	N2a	M0
N2	2-3	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†					III	T1-4a	N1b	M0
							III	T1-4a	N2b	M0
N3	4+ metastatic nodes, or matted nodes, or in transit metastases/satellites with metastatic nodes	c: In transit metastases/satellites without metastatic nodes					III	T1-4a	N2c	M0
							III	T1-4b	N1b	M0
							III	T1-4b	N2b	M0
							III	T1-4b	N2c	M0
							III	T1-4b	N3	M0
M	Site	Serum LDH	IV	Any T	Any N	M1	IV	Any T	Any N	M1
M0	No distant metastases	NA								
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastases	Normal								
M1b	Lung metastases	Normal								
M1c	All other visceral metastases	Normal								
	Any distant metastasis	Elevated								

Abbreviations: NA, not applicable; LDH, lactate dehydrogenase.
 *Micrometastases are diagnosed after sentinel lymph node biopsy.
 †Macrometastases are defined as clinically detectable nodal metastases confirmed pathologically.

Fig. 7 – Classificação por critérios TMN e por estadio anatómico para melanoma cutâneo. (Disponível em: Balch CM et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009;27(36):6199–206.)

A espessura do tumor aumenta com a sua evolução e está diretamente relacionada com o prognóstico do doente. (16) Segundo a *AJCC Melanoma Staging Database* de 2008, a taxa de sobrevivência para 5 e 10 anos diminuiu bruscamente com o aumento da profundidade do tumor. A taxa de sobrevivência a 10 anos, em melanomas classificados como T1 (menos de 1,00 mm de espessura) foi de 92%, diminuindo até atingir 50% em tumores T4 (mais de 4 mm de espessura). (54)

Doentes em estadio IV, com metástases à distância e um nível elevado de LDH tem o pior prognóstico, tendo um tempo médio de sobrevivência entre 8-10 meses. A LDH é um

indicador importante no prognóstico já que catalisa a conversão do piruvato em lactato em condições anaeróbias, característico do microambiente tumoral. (5,55) O local da metástase à distância também é importante no prognóstico. (12) Metástases na pele, tecido subcutâneo ou nódulos linfáticos distantes e LDH normal estão associados a um melhor prognóstico. As taxas de sobrevivência de 1 ano e 2 anos para doentes neste estadio é de 65% e 40%, respetivamente. Metástases pulmonares, mesmo com nível de LDH normal, tem um prognóstico mais reservado. O pior prognóstico verifica-se quando o nível de LDH está elevado ou com metástases em qualquer outro local, com a taxa de sobrevivência de 1 ano e 2 anos de 32% e 18%, respetivamente. (54)

2. Objetivos

Pelos desenvolvimentos que ocorreram nos últimos 40 anos no panorama terapêutico disponível para o tratamento do melanoma maligno, serve a presente monografia para revisão e abordagem dos desenvolvimentos ocorridos nesta área. Os avanços na imunoterapia permitiram o desenvolvimento de novas técnicas e novos fármacos, aprovados pela FDA e EMA nos últimos 10 anos, alterando o prognóstico muito pouco favorável que estava associado ao melanoma maligno metastático.

O objetivo desta monografia é, assim, realizar uma revisão bibliográfica na qual se explore os novos fármacos existentes, como os anticorpos monoclonais ou os inibidores BRAF e analisar o seu mecanismo de ação. Para além disto é relevante comparar a sua eficácia, taxas de resposta e perfil de efeitos adversos tanto com a terapêutica convencional (quimioterapia com dacarbazina) como entre si, de forma a compreender o benefício que justificou a aprovação de cada fármaco.

3. Materiais e métodos

Para a elaboração da monografia foram utilizadas maioritariamente ferramentas de pesquisa online de artigos científicos. Através do acesso à base de dados *PubMed*, pertencente ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com o objetivo de organizar os temas a abordar e adquirir mais conhecimento científico sobre o melanoma maligno metastático. Na fase inicial pesquisaram-se artigos gerais sobre o tema e a patologia, utilizando palavras-chave tais como: “*metastatic malignant melanoma*”, “*skin cancer*”, “*melanoma*” e “*melanoma pathology*” e restringiu-se a pesquisa a artigos publicados nos últimos 5 anos. Ainda assim, foi necessário pesquisa e utilização de artigos mais antigos, para complementação dos temas.

Depois desta pesquisa inicial, a pesquisa foi afinada com o objetivo de obter informação mais concreta sobre cada tema a abordar, como por exemplo, os fatores de risco, quimioterapia, terapêuticas direcionadas, utilizando palavras-chave adequadas a cada tema, continuando a utilizar os artigos mais recentes sobre os temas sempre que possível. Foram utilizadas ainda outras fontes consideradas pertinentes como, por exemplo, a classificação e estadiamento do melanoma pela *American Joint Committee on Cancer* de 2009.

De entre toda a pesquisa apenas foram selecionados artigos na língua inglesa, dando prioridade a artigos mais recentes, com o objetivo de utilizar a informação mais atualizada possível, garantindo sempre que a informação obtida era fidedigna.

4. Cirurgia

O melanoma *in situ*, em estadio 0, encontra-se restrito à epiderme, não sendo invasivo e é responsável por cerca de 27% de todos os melanomas (25) Este pode ser tratado com cirurgia, se detetado precocemente, com taxas de sobrevivência a 5 anos de 98%. (13) Uma vez metastizado, a taxa de sobrevivência diminui significativamente, para 64% em caso de metástases locais e 27% para metástases à distância, tornando-se rapidamente mais resistente ao tratamento. (5,6,13) A intervenção cirúrgica não demonstrou eficácia em casos de doença em estado avançado. (5)

Neste caso, a 1ª opção terapêutica viável é a excisão cirúrgica do tumor e tecido saudável circundante, definida por margem cirúrgica. Como o melanoma é frequentemente localizado na pele, é facilmente acessível para remoção cirúrgica. A cirurgia é geralmente suficiente quando o melanoma se encontra em estadio I. (56) Em tumores com mais de 0,8 mm de espessura ou menos espessos, mas ulcerados, a biópsia do nódulo linfático sentinela é realizada. (5,57) Caso sejam detetadas células malignas de melanoma na biópsia, os nódulos linfáticos sentinela e os nódulos regionais também são removidos. (5)

A excisão ampla do melanoma exige a determinação das margens da excisão. Como as células malignas podem migrar a partir do tumor primário, tanto em extensão como em profundidade, as margens devem ser suficientes para assegurar a excisão completa do melanoma e de qualquer micro-metastase presente localmente. (58,59) Segundo as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network*, o *gold standard* para determinar as margens da excisão tem por base a profundidade de Breslow, a biópsia do nódulo linfático sentinela e são indicadas para tumores com espessura superior a 1 milímetro. Assim, as margens recomendadas de 0,5 a 2,0 cm para além da lesão visível tem por base ensaios da Organização Mundial de Saúde (OMS). Estes estudos avaliaram as diferentes margens clínicas necessárias para permitir a eliminação microscópica de células malignas com base na espessura da lesão primária. (60) A *National Comprehensive Cancer Network* recomenda margens de 1 cm para uma espessura de Breslow menor que 1mm, margens de 1 a 2 cm para espessuras de 1,01 a 2 mm e margens de 2 cm para espessuras maiores que 2 mm. (61)

Apesar disto, a discussão para determinar as margens corretas e diminuir o risco de recorrência ou morte, é contínua. (59,61) Existe consenso que tumores com menos de 1mm podem ser removidos cirurgicamente com margens de 1 cm. (62) Estudos de 2016 comprovaram que margens mais largas favoreciam a taxa de sobrevivência dos doentes. Não existe evidência de que margens menores de 1-2 cm sejam mais seguras que margens mais largas de 3-5 cm. Na verdade, há evidências de que podem ser prejudiciais. (59)

Se, após excisão, as margens ainda se encontrarem positivas, ou seja, se ainda forem detetadas células malignas, dependendo da situação patológica, a reexcisão pode ser necessária, sendo considerada padrão nestes casos. Apesar disto, a probabilidade de ocorrer novamente margens positivas aumenta 10%, já que o MM cresce superficialmente mais rapidamente. (60)

Embora a excisão cirúrgica do melanoma seja o tratamento recomendado, mesmo utilizando terapêutica adjuvante, apenas cerca de 45% dos doentes em estadio III ficam livres de doença após 4 anos. O aumento do conhecimento da fisiopatologia molecular do MM durante a

última década e a identificação de mutações permitiu a utilização de novas opções terapêuticas. (63,64)

5. Quimioterapia

A dacarbazina foi o primeiro e único fármaco de quimioterapia a ser aprovado pela FDA, em 1975, com indicação para o tratamento de melanoma maligno. (Fig. 8) (65)

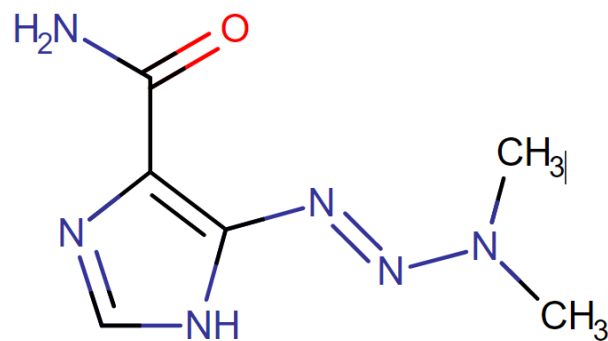


Fig. 8 – Estrutura do fármaco dacarbazina (Disponível em go.drugbank.com/drugs/DB00851)

Até recentemente, o tratamento tipicamente utilizado para melanoma metastático era a dacarbazina. A resposta verificada era baixa, cerca de 13,4% nos casos mais eficazes, com uma sobrevivência de 5 a 11 meses e uma taxa de sobrevivência de 1 ano de 27%. (57,66) Maior parte das respostas eram parciais, apesar de ocorrerem casos pontuais de resposta completa. (66) Apesar da baixa eficácia, não existia nenhuma outra opção mais eficaz ou menos tóxica do que a dacarbazina. (5) Assim, qualquer novo fármaco de quimioterapia deverá ter uma taxa de resposta superior a 13,4% para ser benéfica em comparação à dacarbazina. (66)

A dacarbazina é um pró-fármaco, que é convertido no fígado no composto ativo, o 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (MTIC). A dose tipicamente administrada de dacarbazina é 850 a 1.000 mg/m² a cada 3 semanas. (66)

Os avanços mais recentes melhoraram o prognóstico dos doentes e a utilização de terapias direcionadas e imunoterapia têm superado a quimioterapia, sendo esta cada vez menos utilizada. (5)

6. Mecanismos de resistência à quimioterapia

O *immune editing* é o processo através do qual o tumor desenvolve mecanismos para escapar ao sistema imunológico e prevenir a sua destruição. Este processo está dividido em três fases: eliminação, equilíbrio e evasão. Na fase inicial de eliminação, células como as *natural killer*, células dendríticas, e células B eliminam as células malignas rapidamente, no microambiente tumoral. Esta eliminação ocorre mais rapidamente do que o crescimento das células malignas, pelo que há um decréscimo abrupto das células malignas. Na fase de equilíbrio, as células malignas, que estão em constante crescimento, são eliminadas pelas células do sistema imunológico. Caso o tumor entre na fase de evasão, as células tumorais tornam-se capazes de desenvolver estratégias para neutralização do sistema imunológico, permitindo o seu crescimento descontrolado. (5)

Devido ao desenvolvimento de resistências tão característico do MM, o tratamento com quimioterapia é extremamente difícil e a maior parte das vezes, ineficaz. (67) Com a quimioterapia, as primeiras células a morrer são as suscetíveis aos fármacos. Após a morte destas células, restam as células que são resistentes à quimioterapia e estas multiplicam-se originando tumores que se tornam insensíveis ao tratamento. (68)

A resistência pode ser de dois tipos: intrínseca (ou primária) ou adquirida (ocorre durante o tratamento com fármacos citotóxicos). Um dos fatores que contribui para a ocorrência de resistências é o baixo número de fármacos disponíveis para o tratamento de MM. (67)

O mecanismo de resistência mais comum nas células malignas são as bombas de efluxo. Estas bombas transportam ativamente o fármaco para o exterior da célula maligna, resultando num baixo nível de fármaco no interior da célula e uma baixa eficácia. (69) De entre as 48 bombas de efluxo reconhecidas no ser humano, o melanoma pode expressar até 8 delas. (67) Apesar de nem todos os transportadores de fármacos serem ainda conhecidos, os estudos efetuados até agora indicam que a indução de bombas de efluxo não é a causa principal de resistência no MM. (67) Outro mecanismo de resistência à terapêutica antitumoral está relacionado com a alteração no tipo, função e ativação de enzimas, que pode levar à inativação dos fármacos, o que diminui a quantidade de fármaco disponível para se ligar aos respetivos alvos terapêuticos. (67) A enzima glutationa-S-transferase (GST) é responsável pela destoxificação intracelular de vários fármacos citotóxicos, por conjugação com a glutationa (GSH). (70) Foi determinado que o nível de GSH nas lesões melanocíticas era superior ao observado em nevos benignos. (71) A conjugação dos fármacos com a GSH inibe a formação de ligações *cross-link*, reduzindo o potencial citotóxico dos aductos. (67) A enzima nuclear topoisomerase é essencial na transcrição e recombinação do DNA e na segregação dos cromatídeos na mitose. Vários fármacos citotóxicos tem como alvo esta enzima, inibindo-a. No melanoma, uma mutação de deleção foi associada ao aumento da atividade da topoisomerase II, o que origina resistência a estes fármacos. (72)

Os agentes alquilantes são capazes de provocar lesões no DNA devido à formação de aductos e subsequente inibição da replicação de DNA ou transcrição de RNA, levando à interrupção do ciclo celular na fase G2. (67) A reparação destes aductos pela enzima O6-alquilguanina DNA alquiltransferase prejudica o efeito citotóxico dos fármacos, sendo esta uma importante

via de resistência. (73) MM resistentes aos agentes alquilantes exibem um aumento da capacidade de reparação de danos no DNA. (74)

A apoptose é um programa complexo de morte celular programada que contém várias vias. Existem duas cascatas de ativação da caspase bem caracterizadas, a intrínseca e a extrínseca. As duas vias convergem na ativação de caspases efetoras, indução de endonucleases específicas, o que resulta na fragmentação do DNA e clivagem de proteínas nucleares. Isto impede a manutenção da estrutura celular, reparo e replicação do DNA. (67,75) A morte celular é contrabalançada por moléculas reguladoras como p53, Ras, proteínas Bcl-2 ou IAP. Nas células de melanoma resistentes a fármacos, o microRNA-125a promove a resistência a inibidores BRAF por supressão da apoptose. (76) Tanto o aumento da expressão do MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), regulador negativo da p53 como a perda do inibidor da cinase dependente de ciclina 2A, um fator que impede a degradação da p53 dependente do MDM2, é frequentemente observada em células de MM. (67,77) A proteína anti-apoptótica Bcl-2 encontra-se sobre expressa em células de MM enquanto o Apaf-1, um fator essencial na formação do apoptossoma está sob expresso. (78,79)

7. Terapêuticas avançadas

Durante décadas, nenhum fármaco citotóxico tradicional ou regime de combinação melhorou a sobrevivência global em doentes com melanoma avançado metastático. (61) Nos últimos 10 anos, o tratamento sistêmico de doentes com melanoma avançado sofreu grandes inovações, passando de citocinas e quimioterapia, para opções inovadoras. (80) Diferentes abordagens para ultrapassar a supressão da resposta imunológica no microambiente tumoral foram investigadas. (8) A imunoterapia tem como objetivo induzir e estimular as funções efetoras do sistema imunitário e bloquear a supressão imunológica, utilizando antigénios específicos expressos pelas células tumorais. (8,81) Apesar disto o processo tem desvantagens tais como a heterogeneidade da expressão e apresentação de antigénio à superfície das células e a instabilidade do perfil antigénico, que varia com a proliferação tumoral. (8) Ao contrário da quimioterapia e da radioterapia que interferem com o crescimento tumoral, a imunoterapia intervém diretamente no sistema imunitário, fazendo com que este reconheça as células tumorais como estranhas, eliminando-as. (82)

Após inúmeros insucessos com terapêuticas com vacinas ou citocinas, as primeiras opções terapêuticas de sucesso ocorreram com base nos *checkpoints* co-inibitórios do CTLA-4 (antigénio 4 associado a linfócitos T citotóxicos) e PD-1 (*programmed death 1*), ambos importantes na prevenção da ativação e atividade excessiva de células T. (81) Ocorreram também avanços significativos com o surgimento de novas terapêuticas direcionadas à mutação BRAF, encontrada em grande parte dos casos de melanoma. (83) Em dez anos, nove novos fármacos receberam aprovação para o melanoma avançado, incluindo inibidores seletivos, anticorpos e terapêuticas direcionadas, bem como quatro aprovações para terapêutica adjuvante. (9,84) O primeiro anticorpo anti CTLA-4 aprovado para o MM foi o ipilimumab, em 2011 e inibidores seletivos BRAF, como o vemurafenib, em 2011 e o dabrafenib, em 2013. Desde então, foram aprovados inibidores MEK como o trametinib, aprovado em 2013 e anticorpos anti PD-1 como o pembrolizumab e nivolumab, em 2014. Todas estas inovações terapêuticas ampliaram o potencial da terapêutica para o MM. (Fig. 7) (60,85)

Os avanços verificados tiveram impacto na sobrevivência geral (OS) e a longo prazo dos doentes com melanoma, que aumentou rapidamente com a introdução destas novas terapêuticas. (84,86) Desde 2008 a sobrevivência aumentou de 27,9% para 31,3% em 2012. (86)

Ao longo do tempo, foi comprovado que as terapias mais recentes, como as imunológicas e direcionadas são eficazes em determinados doentes. Ainda assim, mantêm-se o debate quanto às estratégias mais adequadas para maximizar os resultados a longo prazo, tanto quanto à utilização de monoterapia, como quanto à utilização simultânea de diferentes procedimentos ou fármacos. (56) Para auxiliar na decisão da estratégia terapêutica mais adequada, deve ser feita a classificação do melanoma nos seus subtipos moleculares distintos e a compreensão dos diferentes marcadores moleculares que possam prever qual a terapêutica mais eficaz para cada caso. (63) Esta classificação pode ser complexa e dificultar o processo de decisão, já que as proliferações melanocíticas são difíceis de avaliar histologicamente pela ampla falta de critérios objetivos reprodutíveis. (63)

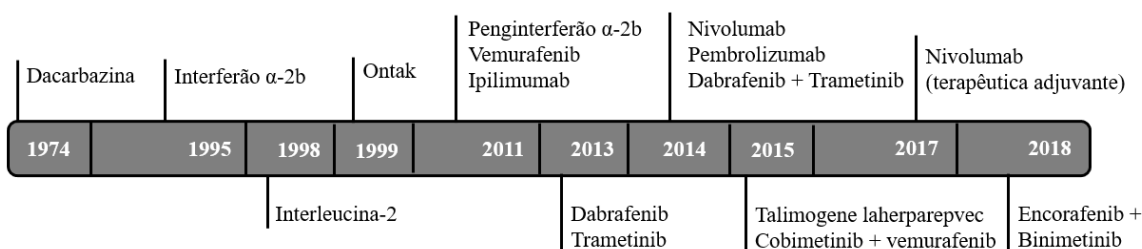


Fig. 9 - Cronologia da aprovação de fármacos para o tratamento do melanoma maligno metastático pela Food and Drug Administration. (Baseado em Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* 2018; Volume 7:35–49)

a) Imunoterapia

Devido ao importante avanço na imunobiologia e biologia molecular do tumor, as descobertas no campo da imunoterapia e das terapêuticas direcionadas revolucionaram o panorama terapêutico para doentes com melanoma. (85) Os mecanismos regulatórios que limitam a ação imunológica antitumoral estão a ser cada vez mais bem caracterizados. (87) Para garantir uma resposta imunológica que cause um efeito antitumoral significativo, é necessário não só um aumento na ativação imunológica, mas também uma redução dos elementos supressores do sistema imunológico. Estes mecanismos têm sido aprofundados com vista ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de tumores malignos. (87,88)

Os linfócitos T têm um papel central na imunidade mediada por células e na imunoterapia do cancro. A ativação destes depende de dois tipos de sinais, um do reconhecimento do antígeno tumoral pelas células T e outro, devido à interação co-estimulatória entre o CD28 à superfície das células T e as células apresentadoras do antígeno B7-1. (89,90) Os recetores co-inibitórios identificados, também conhecidos por *immune checkpoints*, como o CTLA-4 e o PD-1, podem regular negativamente o sistema imunológico, evitando a supra ativação das células T e a ocorrência de autoimunidade. (91) Por exemplo, o CTLA-4 é expresso aproximadamente 48 horas depois da ativação das células T, ligando-se com elevada afinidade ao B7-1. Uma vez no microambiente tumoral, as células T tornam-se funcionalmente inativas por ligação do PD-1 com o seu ligando, PD-L1, expresso pelas células tumorais. (85)

Estes mecanismos de regulação negativa do sistema imunológico são o principal obstáculo na correta atividade antitumoral das células T. Recentemente foram desenvolvidos anticorpos monoclonais direcionados a estes reguladores negativos, permitindo que não ocorra tolerância por parte das células T e restaurando ou aumentando a resposta imune antitumoral. (85) A desregulação dos *immune checkpoints* no MM pode ser ultrapassada com o tratamento com estes anticorpos anti PD1, PD-L1/2 e CTLA-4. (5)

i) Interleucina 2

A primeira imunoterapia para o melanoma avançado foi aprovada pela FDA em 1998. (5,92) A interleucina 2 (IL-2) é um agente imunomodulador capaz de ativar o sistema imunitário, estimulando o fator de crescimento específico de células T, favorecendo o ataque destes linfócitos a células malignas. (5,60,93) O mecanismo de ação exato da IL-2 ainda é desconhecido. (94) Foi aprovada para utilização tanto em monoterapia como em combinação com a dacarbazina. (95)

A IL-2 foi o primeiro fármaco a demonstrar uma taxa de resposta completa numa pequena percentagem de doentes. Apresentou uma taxa de resposta de 16% e uma taxa de resposta completa de cerca de 6%. (96) Apesar destes resultados promissores, estava associada a uma toxicidade significativa. (5)(97)

Efeitos tóxicos como hipotensão, arritmias e toxicidade hepática e renal, não permitiam que a IL-2 pudesse ser utilizada num elevado número de doentes. É apenas recomendada em doentes sem comorbilidades relevantes. O risco de mortalidade associado a este tratamento é de 1-2%, sendo importante selecionar doentes adequados para esta opção terapêutica. (94) Os doentes ideais para este fármaco são doentes jovens, com doença mais limitada, já que apresentam melhores taxas de resposta. (94)

Atualmente, devido à aprovação de fármacos que também demonstraram respostas duradouras no tratamento do melanoma em estadio IV, tal como o ipilimumab, a utilização da IL-2 diminuiu. (94)

ii) Inibidores do CTL4

As opções terapêuticas mais eficazes para o tratamento do MM são os inibidores dos *immune checkpoints*, o primeiro anticorpo aprovado pela FDA foi o inibidor do antigénio 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), em 2011, após ensaios clínicos demonstrarem um aumento na sobrevivência geral e uma taxa de resposta durável, com 15 a 30% dos doentes vivos após 5 anos. (5,60)

O CTLA-4 (CD152) pertence à família B7/CD28 que inibe as células T. (98) Este intervém na imunossupressão diminuindo indiretamente a sinalização através do recetor co-estimulador CD28. Apesar de ambos os recetores se ligarem ao CD80 e ao CD86, o CTLA-4 tem uma afinidade superior ao CD28, reprimindo a resposta imune por sinais inibitórios enviados às células T. (Fig. 10) (5,61,99) O CTLA-4 pode ser expresso em 3 tipos de células: células T regulatórias, células T ativadas ou pelas próprias células tumorais. (98,99)

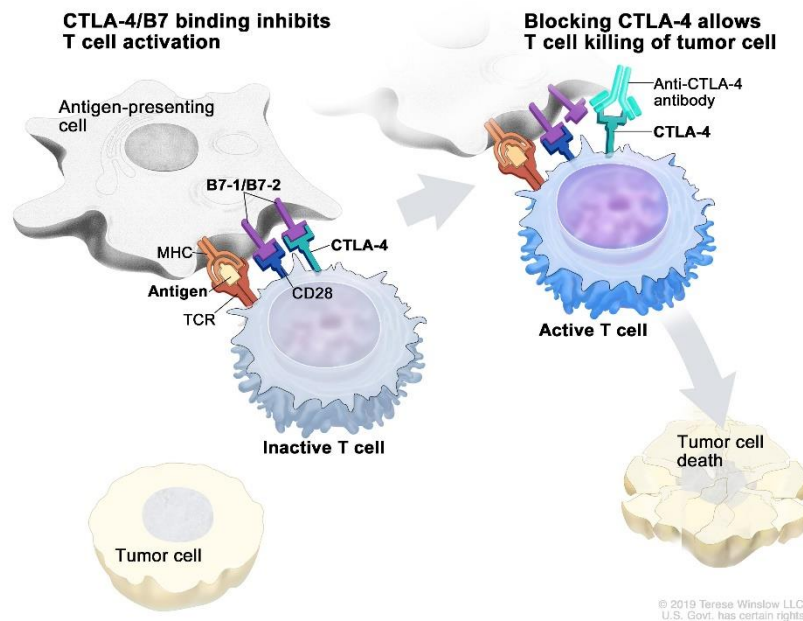


Fig. 10 – Mecanismo de ação do anticorpo anti-CTLA4, Ipilimumab. (Disponível em <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immune-checkpoint-inhibitor>)

O ipilimumab, de nome comercial Yervoy, é o anticorpo monoclonal IgG1 totalmente humano anti CTLA-4 aprovado para o tratamento do MM, desenvolvido pela Bristol-Myer Squibb Pharmaceuticals. (Fig. 11) (82,100) Este suprime o CTLA-4, pelo bloqueio dos ligandos CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígeno ao CTLA-4, regulando positivamente as células imunológicas, potenciando a resposta das células T às células malignas. Assim, dá origem a uma resposta antitumoral sustentada e eficaz. (60,61,82,90,101)

Os ensaios clínicos realizados confirmaram que o ipilimumab trouxe um grande benefício clínico no prognóstico dos doentes com MM. (100) A sua utilização demonstrou uma sobrevivência geral até 10 anos em cerca de 20% dos doentes com MM em estadios III ou IV, resultado nunca antes alcançado. (5,102) Antes da sua aprovação, a sobrevivência média era cerca de 1 ano para doentes em estadios III ou IV de melanoma. (5) Estes resultados promissores observaram-se tanto em doentes previamente tratados (ensaio clínico MDX010-20), como em doentes *naïve* (ensaio clínico CA184-024). (5,85)

O ipilimumab é, habitualmente, administrado numa dose de 3 mg/kg para tratamento do melanoma. Pode ser utilizado independentemente do *status* BRAF. (82,103) A farmacocinética do ipilimumab é linear e independente do tempo, possuindo uma semivida de eliminação de, aproximadamente, 2 semanas. A sua clearance é cerca de 15,3 ml/h e aumenta proporcionalmente com o peso corporal e com a concentração de LDH. Fatores como a idade, sexo, opções terapêuticas utilizadas anteriormente não demonstram efeito na libertação do fármaco. (82,104,105)

Um ensaio clínico de fase III (EORTC 18071) avaliou a hipótese do benefício da utilização do ipilimumab como terapêutica adjuvante, comparada com o placebo. (64) Com a realização de um acompanhamento de 2,7 anos, a terapêutica adjuvante com ipilimumab comprovou ter

benefício em comparação com o placebo. (102) Este ensaio clínico garantiu a aprovação pela FDA, em 2015, do ipilimumab como terapêutica adjuvante para o MM, na dose de 10mg/kg se for utilizado como adjuvante, após remoção cirúrgica. (64) Isto levou a um grande impacto na sobrevivência geral livre de metástases à distância, já que o único fármaco aprovado para terapêutica adjuvante no MM, o interferão α , tem um efeito mínimo na sobrevivência geral. (102,106,107)

Em geral, o risco de morte por MM foi aproximadamente 30% inferior com o ipilimumab em terapêutica adjuvante do que com o placebo, enquanto o risco de desenvolvimento de metástases e morte foi inferior em quase 25%. Após 5 anos, o ipilimumab demonstrou ter uma taxa superior ao placebo em cerca de 10% para todos os seguintes parâmetros: sobrevivência livre de recorrência (40,8% para 30,3%), sobrevivência geral (65,4% para 54,4%) e sobrevivência livre de metástases à distância (48,3% para 38,9%). (64)

Apesar dos evidentes benefícios da terapêutica com ipilimumab, o seu uso vem acompanhado de possíveis efeitos adversos, que podem variar de simples e sem necessidade de tratamento a graves e possivelmente fatais. (82,108) Cerca de 85% dos doentes tratados com ipilimumab sofrem de algum tipo de efeitos adversos, sendo que cerca de 50% sofre de efeitos adversos de grau 3 ou 4. (108) Para além dos efeitos adversos clínicos, que são dependentes de dose, como *rash* cutâneo, fadiga, colite, dispneia, anemia, hepatite e anorexia, existe uma probabilidade de cerca de 25-40% de ocorrência de efeitos adversos imunológicos graves. (60,109,110) Os efeitos adversos imunológicos de grau 3 ou 4 mais comuns com o ipilimumab são gastrointestinais (16%), hepáticos (11%) e endócrinos (8%). Alguns casos de mortes causadas por efeitos adversos já foram registados, com casos de colite, miocardite e falência múltipla de órgãos associada à Síndrome de Guillain-Barré. (64,111) A maior parte dos efeitos adversos de grau 3 e 4 são reversíveis através do tratamento com corticosteróides sistêmicos durante 2-3 semanas. Ainda assim, as endocrinopatias são permanentes e podem necessitar de terapêutica de reposição, como insulina, hormonas tiroideias ou esteróides no caso de insuficiência adrenal. (82,111,112)

iii) Inibidores da PD1

A experiência e investigação clínica decorrentes da aprovação do anticorpo anti-CTLA4, abriram caminho para desenvolver novos inibidores de *immune checkpoints*, ficando estes conhecidos por recetores inibitórios de segunda geração. (85)

Programmed cell death protein 1 (PD-1) é uma proteína transmembranar co-estimuladora negativa, homóloga do CD28. Quando ativa, é capaz de induzir a morte celular programada e de inibir a ativação e proliferação de células T, originando imunossupressão. Este é um regulador essencial da resposta imune adaptativa. (60,98,113,114) Assim, foram desenvolvidos agentes anti-PD1 como possível alvo terapêutico do MM, com o objetivo de aumentar a resposta das células T CD8+ às células tumorais e inibir as células T regulatórias. (Fig. 11) (60)

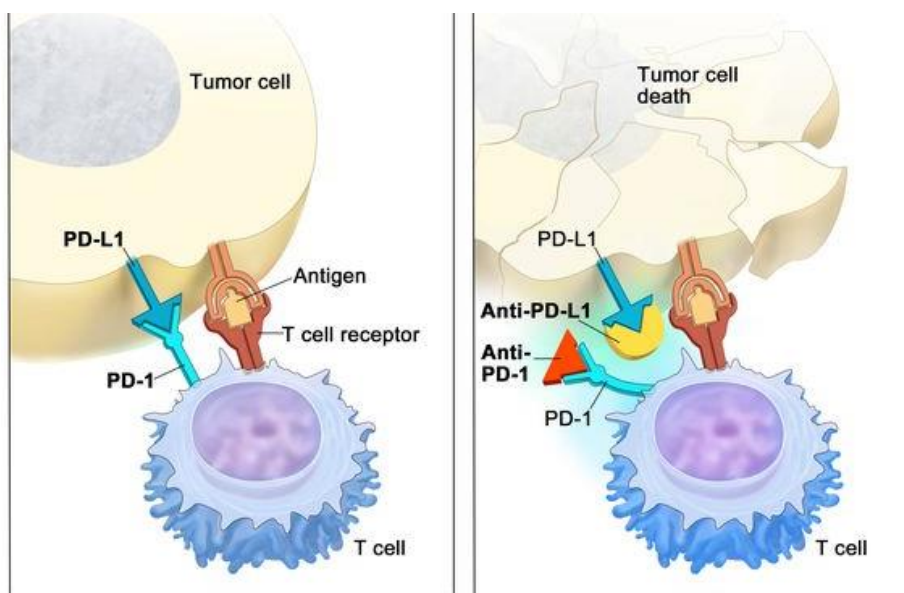


Fig. 11 – Mecanismo de ação do anticorpo anti-PD1. (Disponível em <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immune-checkpoint-inhibitor>)

Existem dois ligandos para o PD-1: o PD-L1 (B7; CD274) e o PD-L2 (B7-DC; CD273) e ambos se podem localizar à superfície de células como as células dendríticas, macrófagos e monócitos, todas consideradas células apresentadoras de antígeno. O ligando PD-L1 é mais amplamente expresso do que o PD-L2. Ambos são regulados por feedback negativo para proteger os tecidos de danos imunológicos excessivos ou os tumores de ataques imunológicos. A expressão destes ligandos é induzido por várias moléculas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), sendo o mais potente o interferão γ (IFN- γ). (82,99,113,115,116) O microambiente tumoral do MM é caracterizado por um nível elevado de mediadores inflamatórios, o que pode ser a causa da sobre regulação da expressão do PD-L1 e cooperativamente estimular a progressão tumoral. (117)

O *immune checkpoint* PD-1/PD-L1 foi uma via de supressão da resposta imunológica que se tornou central nas mais recentes abordagens terapêuticas de tumores sólidos como o MM. (114) Foi comprovado o benefício desta opção terapêutica em ensaios clínicos em doentes com progressão da doença durante o tratamento com ipilimumab e inibidores BRAF ou MEK, um grupo que não têm outras opções terapêuticas viáveis. (60)

O facto de se obter uma atividade tumoral durável e tolerável para os doentes de MM é uma grande vantagem desta opção terapêutica, mas tem a desvantagem de apenas um terço os doentes responder ao tratamento. Isto faz com que surja a necessidade da procura de biomarcadores para a seleção de doentes que respondam e beneficiem dos inibidores da PD-1. (85) Apesar da investigação, ainda não existem dados conclusivos neste tópico.

Os dois anticorpos aprovados pela FDA para a PD-1 foram o nivolumab e o pembrolizumab, ambos em 2014. (61) O pembrolizumab também possui um perfil de segurança superior com maior eficácia do que o anticorpo anti-CTLA4 aprovado, o ipilimumab. (118)

O nivolumab, de nome comercial Opdivo, é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G4 anti-PD1 indicado para o tratamento do MM, como monoterapia ou em combinação, independentemente do doente apresentar mutação BRAF, aprovado em 2014. (82,119) O nivolumab também tem indicação para terapêutica adjuvante para doentes com MM e envolvimento dos gânglios linfáticos ou com MM em remissão completa, para o qual recebeu aprovação em 2017. (82) Este fármaco pode ser administrado na dose de 3 mg/kg ou em doses únicas de 240 ou 480 mg. (82)

A farmacocinética do nivolumab é linear, dividida em duas fases. A fase inicial é uma fase de distribuição rápida, com uma semivida de, aproximadamente, 32 horas. A fase de eliminação é lenta, atingindo 25 dias. A sua clearance e o volume de distribuição aumentam proporcionalmente com o peso corporal. (82)

O nivolumab apresentou uma taxa de resposta geral de cerca de 30% para uma variedade de tumores sólidos em ensaios clínicos de fase I. (120) Um ensaio clínico de fase III em doentes com MM demonstrou uma sobrevivência média de 16.8 meses e uma taxa de sobrevivência aos 2 anos de cerca de 43%. (121)

Comparado com a dacarbazina em doentes com MM refratários ao tratamento com ipilimumab, o ensaio clínico de fase III *CheckMate-037* demonstrou uma resposta superior (31,7% *versus* 10,6%) e menor ocorrência de efeitos adversos de grau 3 e 4 (5% *versus* 9%) com a terapêutica com nivolumab, demonstrando um benefício clínico evidente. (85,122) Num outro ensaio clínico, voltou a comprovar-se a superioridade do nivolumab, já que, comparado com a dacarbazina, demonstrou ter uma taxa de sobrevivência por 1 ano de 72,9% (*versus* 42,1%) e uma diminuição em cerca de 6% na ocorrência de efeitos adversos de grau 3 ou 4. (85,123)

Quanto aos efeitos adversos, em monoterapia, o nivolumab é caracterizado por causar fadiga, *rash* cutâneo, dor muscular e óssea, prurido, colite e artralguas. (82) Ainda assim, a toxicidade imunológica é, por norma, menos frequente e menos severa do que com o ipilimumab. (61)

O pembrolizumab, de nome comercial Keytruda, é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina com isótopo G4-kappa humanizado anti-PD1 altamente seletivo. Com base na efetividade antitumoral e no perfil de segurança aceitável, determinados no ensaio clínico *KEYNOTE-001*, sendo o segundo anticorpo a ser aprovado para este alvo terapêutico, pela FDA em setembro de 2014. (82,85,124)

A aprovação deste fármaco foi promissora já que, em ensaios clínicos, originou uma resposta duradoura e sustentada em doentes com MM. (85) Mais concretamente, demonstrou um decréscimo de 73% do tamanho da lesão maligna, impediu a progressão da doença durante 24 semanas em cerca de 45% dos doentes, teve uma taxa de resposta geral de 37% e uma taxa de controlo da doença de 50%. Após 1 ano, demonstrou uma taxa de sobrevivência geral de 74% (5,124)

Um ensaio clínico de fase II (KEYNOTE-002) serviu para comparação entre o pembrolizumab e a quimioterapia, em doentes que não obtiveram resposta após tratamento com ipilimumab. Foi obtida uma taxa de sobrevivência sem progressão da doença de 35% (na dose de 2 mg/kg) e quase 40% (na dose de 10 mg/kg) enquanto a quimioterapia apenas demonstrou 16%. A taxa de resposta também demonstrou ser cerca de 15 pontos percentuais superior para o pembrolizumab. Concluiu-se destes resultados que a utilização do pembrolizumab no tratamento do MM duplicou a sobrevivência sem progressão de doença após 6 meses, em doentes refratários ao ipilimumab. (85,125)

Mais recentemente foi comparado o pembrolizumab com o ipilimumab, verificando-se a superioridade do primeiro em todos os pontos avaliados: sobrevivência sem progressão da doença (47,3% para 26,5%), taxa de sobrevivência de 1 ano (74,1% para 58,2%) e toxicidade de alto grau (13,3% para 19,9%). (118)

b) Terapêuticas direcionadas

i) Inibidores da BRAF

A descoberta da mutação BRAF foi um marco para o aparecimento de novos fármacos direcionados a este alvo terapêutico. (126) Ao contrário da quimioterapia, que ataca qualquer célula em divisão, esta terapêutica tem como alvo uma mutação molecular específica num determinado tipo de células malignas. Este tipo de terapêuticas personalizadas revolucionaram a terapêutica do MM. (85)

Cerca de 35 a 50% dos melanomas apresentam a mutação BRAF, sendo esta mais predominante em doentes mais jovens. A mutação BRAF mais comum (perfazendo cerca de 80% das mutações em MM) é conhecida por V600E, uma mutação somática *missense* com a substituição de valina (V) por ácido glutâmico (E) no codão 600. Esta condição leva à ativação constitutiva da via da proteína quinase ativada pelo mitogénio (MAPK), causando proliferação celular e inibição da apoptose. (Fig. 12) (126–129)

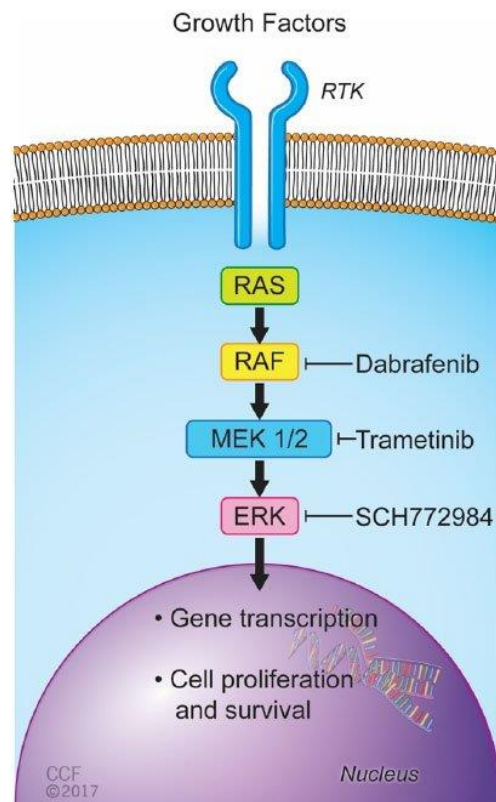


Fig. 12 – Mecanismo de ação dos inibidores BRAF e MEK: criação de um ponto de bloqueio da via da proteína quinase ativada pelo mitogénio (MAPK) em dois níveis distintos, inibindo a sinalização e originando paragem do ciclo celular. (Disponível em Khunger A, Khunger M, Velcheti V. Dabrafenib in combination with trametinib in the treatment of patients with BRAF V600-positive advanced or metastatic non- small cell lung cancer: clinical evidence and experience. *Ther Adv Respir Dis.* 2018;12:1–9.)

No caso de doentes com esta mutação, podem ser utilizados os inibidores BRAF, como o vemurafenib e o dabrafenib, e devem ser considerados também para doentes com metástases distantes com a mesma mutação. (60) Estes inibidores são pequenas moléculas capazes de bloquear a via MAPK, inibindo a proliferação celular descontrolada. (81)

O primeiro inibidor BRAF desenvolvido foi o sorafenib, mas não demonstrou respostas significativas nos estudos pré-clínicos devido à sua baixa especificidade, não recebendo aprovação para o tratamento do MM. (130)

Mais tarde, foram desenvolvidos fármacos mais potentes e mais específicos. Um dos grandes marcos na revolução do tratamento do MM foi o ensaio clínico de *Flaherty* (131) que demonstrou benefício do vemurafenib em cerca de 80% dos doentes com MM em estadio IV com mutação BRAF. Até esse momento, nunca tinham sido atingidas taxas de resposta tão elevadas para o MM em estadio IV, sendo este o primeiro inibidor BRAF a demonstrar benefício no aumento da sobrevivência livre da progressão da doença. (83,94) Segundo o ensaio clínico de fase III, *BRIM-3*, quando comparado à quimioterapia com dacarbazina, verificou-se uma taxa de sobrevivência de 13,6 meses para o vemurafenib em comparação com 9,7 meses na dacarbazina e uma média de tempo de vida sem progressão da doença de 6,9 meses comparados com 1,6 meses, demonstrando uma superioridade relevante na eficácia. (83)

Outro inibidor BRAF que demonstrou eficácia clínica equivalente ao vemurafenib foi o dabrafenib. Num ensaio clínico de fase III com doentes de melanoma em estadio III ou IV, verificou-se uma taxa de sobrevivência sem progressão de doença de 5,1 meses para o dabrafenib em comparação com 2,7 meses para a dacarbazina. (132) Num outro ensaio clínico, *BREAK 3*, demonstrou uma sobrevivência geral de 16,6 meses, sendo muito superior à dacarbazina. (132)

Está comprovado que os inibidores BRAF aumentam significativamente a sobrevivência sem progressão de doença e a sobrevivência geral. Apesar da rápida indução de respostas, há desenvolvimento rápido de resistência através de resistência secundária (por exemplo, através de bombas de efluxo) ou reativação da via cinase MAPK secundária, estando frequentemente associada a recidiva entre 6 e 10 meses. (60,81)

A terapêutica com estes inibidores está associada a vários efeitos adversos. Tanto o vemurafenib, como o dabrafenib têm efeitos adversos em comum, tais como artralgia, *rash* cutâneo, fadiga, que podem ser controlados através de ajustes de dose dos fármacos. Ainda assim, cada inibidor BRAF tem um perfil de toxicidade característico e efeitos adversos limitantes distintos. No caso do vemurafenib, o efeito adverso mais limitante é a fotossensibilidade cutânea, enquanto no dabrafenib é a febre. (83,132) A resolução dos efeitos adversos é frequente e permite retornar à dose completa dos fármacos para continuação do tratamento. Além disto, verificou-se que doentes tratados com inibidores BRAF em monoterapia apresentam um risco de 15 a 30% de desenvolver cancro da pele não melanoma, tal como carcinoma das células escamosas ou ceratoacantomas, pela ativação paradoxal da via da proteína quinase ativada pelo mitogénio (MAPK). (83,132–135)

Após a descoberta dos inibidores BRAF, 4 grandes ensaios clínicos de fase III (*COMBI-d*, *COMBI-V*, *coBRIM* e *COLUMBUS*) estudaram a hipótese e comprovaram a superioridade da conjugação de inibidores BRAF com inibidores MEK, em comparação com monoterapia com inibidores BRAF em doentes com melanoma metastático que não utilizaram nenhuma outra opção terapêutica. (136–139) Esta combinação demonstrou prolongar tanto a sobrevivência sem progressão de doença como a sobrevivência geral, e diminuir a toxicidade em comparação à monoterapia. A combinação demonstrou menor incidência de lesões cutâneas desmoplásicas. É importante referir que todas as combinações de inibidores BRAF e inibidores MEK são indutores do citocromo P450, pelo que devem ser consideradas e monitorizada possíveis interações fármaco-fármaco e fármaco-alimento. (81)

A combinação do inibidor MEK trametinib com dabrafenib revelou uma taxa de resposta geral de 69% com uma sobrevivência geral média de 25.1 meses, em comparação com 18,7 meses em monoterapia com dabrafenib e uma sobrevivência sem progressão de doença de 11 meses, em comparação com 8,8 meses em monoterapia. Esta combinação foi, assim, aprovada em 2014. A combinação do inibidor MEK cobimetinib com vemurafenib demonstrou também resultados promissores, sendo aprovada pela FDA em 2015. (Fig.7) (81)

Apesar da resposta ser de curta duração com esta combinação, é relevante que cerca de 25% dos doentes beneficia com o controlo do melanoma e com a sobrevivência a longo prazo. (81) A combinação dabrafenib + trametinib já atingiu uma taxa de 3 anos sem progressão de doença de 22%. (136)

Mais recentemente, em junho de 2018, foram aprovados para doentes com melanoma metastático irrecorrível ou com mutação BRAF V600E, a combinação de encorafenib com binimetinib. O encorafenib, nome comercial Braftovi, é um inibidor BRAF enquanto o binimetinib, de nome comercial Mektovi, é um inibidor MEK e estes têm como alvo diferentes proteínas cinase da via RAS/RAF/MEK/ERK. O binimetinib inibe reversivelmente as enzimas MEK1, MEK2 e a MEK dependente de fosforilação, reduzindo a viabilidade celular nas linhas melanocíticas com mutação BRAF. (140) A combinação demonstrou uma maior ação antiproliferativa de células com mutação BRAF do que os fármacos em monoterapia. Para além disto, também foi capaz de inibir o crescimento do tumor de uma forma mais eficaz e atrasou o aparecimento de resistências em modelos animais. (140)

Uma das grandes vantagens destes fármacos é terem boa biodisponibilidade oral, o que permite a sua administração via *per os* com água, visto que sumos podem ter interação com o encorafenib. A dose aconselhada de encorafenib é de 450 mg, uma vez por dia e 45 mg, duas vezes ao dia, de binimetinib. O tratamento com a combinação deve ser continuado enquanto houver progressão da doença e não se observe toxicidade exacerbada. (140,141)

De acordo com o ensaio clínico *COLUMBUS Parte I*, a terapêutica combinada de encorafenib e binimetinib prolonga a sobrevivência livre de progressão de doença e reduz o risco de morte em cerca de 40% quando comparada à monoterapia com vemurafenib em doentes com melanoma avançado com mutação BRAF. Neste ensaio, os participantes foram randomizados entre a terapêutica com combinação encorafenib (450 mg uma vez por dia) e binimetinib (45 mg duas vezes por dia), terapêutica de monoterapia com vemurafenib (960 mg duas vezes por dia) e terapêutica de monoterapia com encorafenib (300 mg uma vez por dia). Após um

acompanhamento de cerca de 17 meses, a sobrevivência sem progressão de doença média foi significativamente mais longa com a terapêutica de combinação (14,9 meses) do que com a monoterapia com vemurafenib (7,3 meses) e do que com a monoterapia com encorafenib (9,6 meses). Foi atingida uma resposta em cerca de 63% dos doentes com a terapêutica de combinação, não sendo atingidos valores superiores aos 50% para os outros grupos controle. A sobrevivência geral no grupo de terapêutica de combinação foi de 33,6 meses, comparado com 16,9 meses na monoterapia com vemurafenib e 23,5 meses na monoterapia com encorafenib. (139,140) O ensaio clínico COLUMBUS Parte II, diminuiu a dose do encorafenib para 300 mg na terapêutica de combinação, para comprovar a eficácia do encorafenib na combinação em comparação à monoterapia. A sobrevivência sem progressão de doença foi de 12,9 meses comparado com 9,2 meses na monoterapia com encorafenib. Após dois anos, a sobrevivência global com a combinação foi de 57,6% em comparação com 49,1% da monoterapia com encorafenib e 43,2% da monoterapia com vemurafenib. (142,143)

A combinação de encorafenib com binimetinib apresenta um perfil de tolerabilidade controlável em doentes com melanoma maligno metastático. Os efeitos adversos mais frequentes, que ocorreram em mais de 25% dos doentes, foram náuseas, diarreia, vômitos, fadiga, visão turva, dor abdominal, espasmos e artralgia. Esta combinação é caracterizada por um risco relativamente baixo de pirexia, reações cutâneas e fotossensibilidade, quando comparado com outras opções terapêuticas. (139–141,144) Efeitos adversos mais raros, mas de maior gravidade também já foram reportados como hemorragias, disfunção ventricular esquerda ou retinopatias. 19% dos doentes do ensaio clínico *COLUMBUS* sofreram eventos hemorrágicos, sendo a maior parte destes casos hemorragias gastrointestinais, mas hemorragias intracranianas fatais já foram reportadas também. Os efeitos adversos, sendo maioritariamente de grau 1-2, podem ser controlados por interrupção da terapêutica ou redução de dose. Caso a dose de binimetinib seja retirada, a dose de encorafenib deve ser reduzida para um máximo de 300mg diárias, até reintrodução do binimetinib. Se o encorafenib for descontinuado deve ser retirado também o binimetinib. (140,141,144)

Já foram relatados casos de novos tumores malignos cutâneos primários, como carcinoma de células escamosas, ceratoacantoma, carcinoma basocelular ou novo melanoma primário e neoplasias não cutâneas em doentes com terapêutica em monoterapia com encorafenib ou de combinação com binimetinib. (139)

c) *Adoptive Cell Immunotherapy*

Adoptive Cell Immunotherapy (ACI) é uma opção terapêutica inovadora, que tem por base a infusão nos doentes com células T anti-tumorais específicas para antígenos do MM expandidos *ex vivo*. É considerada uma terapêutica *in vivo* personalizada a cada doente, e obteve excelentes resultados nos ensaios pré-clínicos e clínicos, sendo considerada a terapêutica que garante regressão da doença completa e duradoura. (8,145) É considerada uma terapêutica *in vivo* já que as células administradas ao doente vão proliferar *in vivo* e ter uma ação antitumoral eficaz e prolongada no tempo. (85,145)

Os linfócitos são obtidos de duas formas: a partir de linfócitos infiltrados no tumor ou a partir de linfócitos T hospedeiros geneticamente modificados que possuem recetores do linfócito T antitumoral. (85,145) A forma mais comum de produção destes linfócitos está representada na Fig. 8. A amostra retirada do tumor é digerida numa suspensão com uma única célula ou dividida em fragmentos e este são postos em crescimento com IL-2, individualmente. Como estes linfócitos têm uma taxa de crescimento superior, destroem os tecidos malignos em 2-3 semanas, ficando assim uma cultura de linfócitos pura. Após 5-6 semanas da excisão cirúrgica do tumor até 10^{11} linfócitos são infundidos no doente. (145)

Esta foi uma terapêutica promissora, já que melhorou as taxas de cura no MM em 20 a 40%. (146) Múltiplos ensaios clínicos reportaram que a técnica de ACI combinada com a linfodepleção alcançou resultados únicos com 40-70% de taxa de resposta clínica e cerca de 40% dos doentes a manterem uma resposta completa por um longo período de, pelo menos, 7 anos. (147,148)

Apesar de todas as vantagens deste processo, os maiores desafios encontram-se na pouca quantidade de instituições com o equipamento necessário e o pessoal qualificado para desenvolver tal técnica. (85)

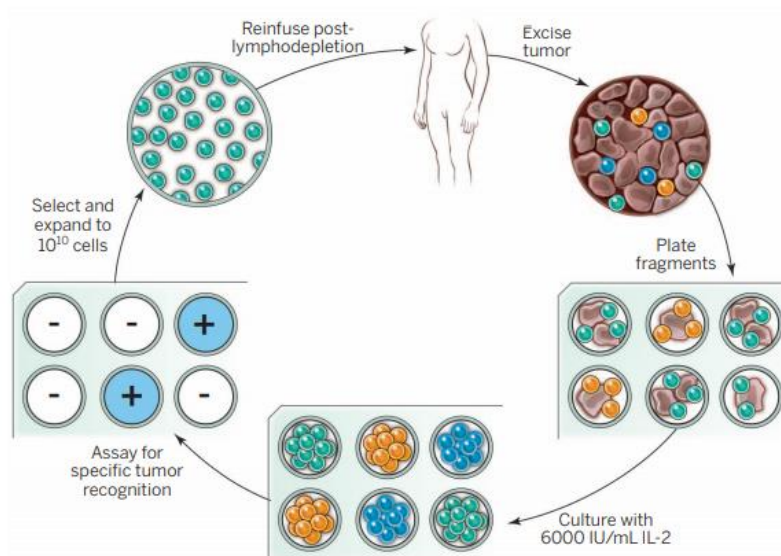


Fig. 13 - Protocolo do método *adoptive cell immunotherapy*. (Disponível em: Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. Science (80-). 2015;348(6230):62–8.)

d) Terapêuticas combinadas

A utilização dos inibidores CTLA-4 e PD-1 em monoterapia já demonstrou ter um elevado benefício clínico a longo prazo. (85) Ambos vão bloquear, de forma independente, a sinalização da via CD3/CD28. A imunidade tumoral é negativamente regulada pelo CTLA-4 e pelo PD-1 por vias independentes e distintas. (149) Enquanto o CTLA-4 tem ação no início da ativação dos linfócitos T na fase de iniciação, o PD-1 atua na fase efetora, contribuindo para a exaustão das células T. Estudos pré-clínicos demonstraram que os dois inibidores atuam em sinergia. (85,99,149–151)

Dados mais recentes demonstraram um benefício clínico da utilização de ipilimumab em combinação com inibidores PD-1. (100) Um ensaio clínico de fase II realizado em 2015 (Postow et al.) comparou a terapêutica de combinação de nivolumab + ipilimumab com a monoterapia com ipilimumab em doentes com melanoma avançado sem tratamento prévio com outros fármacos. Concluiu que se obteve uma resposta objetiva relevante tanto em tumores BRAF *wild-type* (61% vs. 11%) como em tumores com mutação BRAF (52% vs. 22%). (152)

Um ensaio clínico duplamente cego foi realizado em 2015 em doentes com melanoma em estadio III ou mais, tratado com uma combinação de ipilimumab + nivolumab em comparação com nivolumab e ipilimumab em monoterapia. O grupo que recebeu a combinação dos fármacos levou nivolumab numa dose de 1 mg/kg combinado com ipilimumab na dose de 3 mg/kg cada 3 semanas, num total de 4 doses, seguido de nivolumab na dose de 3 mg/kg a cada 2 semanas, até progressão de doença ou toxicidade inaceitável. Os grupos que receberam monoterapia foram tratados com 3 mg/kg cada 2 semanas de nivolumab com placebo ou 3 mg/kg cada 3 semanas de ipilimumab com placebo. As taxas de resposta foram superiores para a terapêutica de combinação, com 57,6%, seguido de 43,7% do nivolumab e 19% para o ipilimumab. O tempo médio até progressão da doença foi 11,5 meses para a terapêutica de combinação, 6,9 meses para o nivolumab e 2,9 meses para o ipilimumab. A sobrevivência geral foi de 58% para a combinação dos fármacos, 52% para o nivolumab e 34% para o ipilimumab. (112,149)

Apesar da maior eficácia, a combinação dos dois agentes levou a um aumento do risco de aparecimento de efeitos adversos. A inibição destes recetores está assim associada a uma série de efeitos adversos categorizados como efeitos adversos imunológicos e ocorrem especialmente devido à inflamação de órgãos não alvo. (85,99,153) Foi verificada uma ocorrência significativamente superior de efeitos adversos quando feita terapêutica de combinação, comparando com a monoterapia. Cerca de 59% dos doentes tiveram algum tipo de efeito adverso de grau III ou IV. Estes efeitos adversos incluem vômitos, náuseas, rash, dispneia, hipotireoidismo e aumento nos níveis de função hepática. (82,100,112,149,152) Os efeitos adversos que ocorrem mais cedo são os dermatológicos, em que mais de metade dos doentes a fazer ipilimumab desenvolvem prurido ou *rash* cutâneo. (85) O reconhecimento precoce destes efeitos e a administração de imunossuppressores melhora estes efeitos sem prejudicar o efeito antitumoral. Alguns doentes podem desenvolver endocrinopatias que podem exigir tratamento crónico com insulina, terapêutica hormonal de substituição ou corticosteróides. (82,85) Houve casos reportados de doentes com psoríase que, com o

tratamento, sofreram uma exacerbação da sua condição e até desenvolvimento de novas patologias autoimunes como a diabetes tipo 1. (154,155) Embora raro, podem ocorrer mortes devido aos efeitos adversos graves, ocorrendo em menos de 1% dos doentes. (85,156) Com os inibidores PD-1 foi reportada a ocorrência de mortes devido a desenvolvimento de pneumonia em alguns doentes. (120)

Apesar da elevada efetividade desta associação para cerca de 50% dos doentes, a maioria acaba por desenvolver resistências em relativamente pouco tempo. (5) Ainda assim, foi concedida aprovação pela FDA em janeiro de 2016, para doentes com melanoma metastático independentemente do *status* BRAF

Como os inibidores dos *immune checkpoints* atuam removendo os “travões” do sistema imunológico, em vez de aumentar diretamente a função imunológica, os doentes também podem beneficiar de terapêuticas combinadas com fármacos imuno-estimulantes. (99) Assim, uma opção é a utilização de vacinas anti-tumorais em combinação com ipilimumab. O fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) aumenta a ativação de células dendríticas para a apresentação do antígeno e potencia a atividade tumoral das células T. Foi possível concluir que a vacina anti tumoral secretora de GM-CSF minimiza a supressão das células T regulatórias, restaurando a atividade das células T efetoras. A combinação das vacinas anti-tumorais com ipilimumab demonstrou uma melhoria na sobrevivência por 1 ano em doentes com MM metastático (68.9% vs 52.9%). (88)

O *talimogene laherparepvec*, uma estirpe modificada do vírus herpes simplex tipo 1 foi aprovado em 2015 para o tratamento de MM. Este foi desenvolvido para se replicar nas células malignas e libertar GM-CSF, atraindo células imunes para o ambiente tumoral. Esta inovação demonstrou uma melhoria na resposta quando comparado com monoterapia com inibidores dos *immune checkpoints*. (9)

8. Perspetivas Futuras

A abordagem terapêutica de primeira linha para o melanoma avançado baseia-se em imunoterapia com anticorpos monoclonais ou terapêuticas direcionadas com inibidores BRAF. O desenvolvimento de novas opções terapêuticas é extremamente importante para o benefício dos doentes com melanoma maligno. (157) Novos alvos terapêuticos encontram-se sob constante estudo, como o LAG3, TIM3, OX40, CD137, entre outros. Por exemplo, o LAG3 é um recetor transmembranar tipo I que é principalmente expresso em células T ativas, células NK e células dendríticas. Níveis elevados de LAG3 foram detetados em células Treg imunossupressoras em doentes com melanoma. O LAG3 está relacionado com a regulação negativa da resposta das células T, facilitando a evasão tumoral. (157,158) A ativação continuada de células T em doenças malignas leva à co-expressão de LAG3 juntamente com outros recetores inibitórios, como o TIM-3. (159) O OX40 encontra-se sobre expresso em células Treg que se encontram no microambiente tumoral. Utilizar este alvo torna o *targeting* mais específico, evitando a ativação sistémica das células T-reg, o que diminui o risco de efeitos adversos. (160) Estudos relevaram que o OX40 regula diretamente a citotoxicidade de células CD8+ reativas ao tumor. Dados *in vivo* demonstraram que a terapêutica anti-OX40 aumenta a atividade antitumoral de células T CD8+ reativas ao tumor, pelo que será um alvo terapêutico promissor. (161)

Outro desenvolvimento recente são os anticorpos CTLA-4 de segunda geração. O ipilimumab-NF é uma versão não fucosilada que demonstrou atividade antitumoral mais potente e depleção de linfócitos T-reg no microambiente tumoral em comparação com o ipilimumab tradicional. Outra opção é o ipilimumab *probody* que se torna ativo no local de ação, reduzindo os efeitos fora do órgão alvo. (82)

O *talimogene laherparepvec* (TVEC) é um tratamento com toxicidade limitada fácil de utilizar no meio ambulatorio, pelo que pode ser uma opção viável para doentes com doença não metastática. De momento, estão sob estudo uma série de combinações com outros fármacos anti-tumorais, como os anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD1. Um ensaio clínico de fase Ib que testou a combinação de TVEC com ipilimumab demonstrou um perfil de segurança favorável com uma taxa de resposta global de cerca de 50%. (162)

Apesar de já estarem definidas terapêuticas de primeira e segunda linha, é importante determinar qual a melhor sequência dos fármacos para o tratamento de doentes com melanoma maligno. Um ensaio clínico de fase III (NCT02224781) está neste momento a decorrer no qual se compara o tratamento com dabrafenib e trametinib seguido de nivolumab com a utilização de nivolumab seguido de dabrafenib e trametinib.(163)

Outros ensaios clínicos que também estão em desenvolvimento estudam combinações semelhantes com vários inibidores de *immune checkpoints*. Os dados de um ensaio clínico de fase I (NCT02027961) demonstraram um perfil de segurança aceitável para uma combinação tripla de um anticorpo PD-L1 em combinação com dabrafenib e trametinib. (163) Outros estudos avaliam a eficácia e segurança da utilização de encorafenib e binimetinib seguidos de uma ação imunomodulatória com a combinação de ipilimumab e nivolumab (SECOMBIT) ou de um anticorpo anti-PD1 como o pembrolizumab (IMMU-TARGET). (140)

9. Conclusões

Após mais de 40 anos, marcados pela inexistência de opções terapêuticas e pelo insucesso dos ensaios clínicos, a terapêutica do melanoma foi revolucionada pelo aparecimento da imunoterapia. A aprovação da IL-2 e da *adoptive cell immunotherapy*, por exemplo, foi um passo importante na alteração do paradigma do melanoma maligno metastático. Apesar deste avanço, a grande revolução da terapêutica do melanoma ocorreu com a introdução de anticorpos monoclonais capazes de inibir determinados *immune checkpoints*. O ipilimumab, um inibidor do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4), foi o primeiro anticorpo monoclonal a ser aprovado, em 2011, pela FDA. Depois deste, foram aprovados em 2014 o nivolumab e o pembrolizumab, dois anticorpos anti-PD1. Ambas as classes de anticorpos monoclonais demonstraram ser clinicamente benéficos em comparação com a quimioterapia. Enquanto a quimioterapia não demonstrou melhorar as taxas de sobrevivência, estas novas opções de imunoterapia apresentaram taxas de resposta e de sobrevivência sem progressão da doença significativamente superiores.

Quando utilizados em monoterapia, o nivolumab foi o anticorpo monoclonal que demonstrou ter um maior benefício clínico. Até a aprovação deste anticorpo, o ipilimumab foi considerado de 1º linha, por ter demonstrado superioridade em comparação à terapêutica convencional, a quimioterapia com dacarbazina. Além de uma taxa de resposta superior, o nivolumab demonstrou ainda menor ocorrência de efeitos adversos, passando este a ser considerado clinicamente superior ao ipilimumab.

Após a determinação do benefício destes anticorpos em monoterapia, houve o interesse na opção da combinação das duas classes de inibidores que, por terem mecanismos de ação distintos, poderiam exercer uma ação sinérgica. A utilização da combinação destes anticorpos demonstrou taxas de resposta superiores às obtidas em monoterapia, o que levou à aprovação da combinação do anticorpo anti-CTLA-4 e o inibidor anti-PD1.

Após a imunoterapia, foram procuradas opções mais direcionadas às características clínicas dos doentes. Em cerca de metade dos doentes com melanoma foi detetada uma mutação no oncogene BRAF, sendo a V600E a mutação mais frequente. Apesar de apenas utilizados nos doentes com tais características, foram desenvolvidos, assim, os inibidores BRAF.

Apesar dos avanços relevantes na terapêutica do melanoma, a escolha da terapêutica a utilizar nem sempre é fácil, pelo desenvolvimento rápido de resistências que continua a ocorrer na imunoterapia. Para deteção da mutação BRAF são utilizados testes genéticos, o que indica a viabilidade da utilização dos inibidores BRAF em determinados doentes. Para além desta mutação, estão por concluir que biomarcadores serão realmente úteis para auxiliar o processo de decisão da terapêutica a utilizar pelos clínicos. É também importante determinar o objetivo da terapêutica, já que o tempo de resposta varia com a terapêutica selecionada. Os anticorpos monoclonais, apesar de apresentarem taxas de resposta superiores, têm um início de ação tardio, o que pode ser desadequado em alguns doentes. Pelo contrário, os inibidores BRAF apresentam uma resposta menos prolongada, mas mais rápida.

Assim, a imunoterapia foi o grande avanço na terapêutica do melanoma maligno metastático, que revolucionou o péssimo prognóstico associado ao diagnóstico da doença. Outros

fármacos, que se encontram em ensaios clínicos podem ser aprovados brevemente. Para além do desenvolvimento de novos fármacos, há um grande esforço para a determinação de biomarcadores preditivos do prognóstico e da eficácia das terapêuticas, que auxiliem da escolha da terapêutica mais indicada para cada doente, tendo uma terapêutica o mais personalizada e com o melhor resultado possível.

10. Referências Bibliográficas

1. Gordon R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs.* 2013;29(3):160–9.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer.* 2018;103:356–87.
3. Gandhi SA, Kampp J. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Med Clin North Am.* 2015;99(6):1323–35.
4. Linares MA, Zakaria A, Nizran P. Skin Cancer. *Prim Care - Clin Off Pract.* 2015;42(4):645–59.
5. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ, Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;0(0):1–14.
6. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. *Lancet.* 2018;392(10151):971–84.
7. Rigel DS. Epidemiology of Melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2010;29(4):204–9.
8. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;115(May):36–49.
9. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* 2018;Volume 7:35–49.
10. Hearing VJ. Biogenesis of pigment granules: A sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci.* 2005;37(1):3–14.
11. Kibbi N, Kluger H, Choi JN. Melanoma: Clinical presentations. *Cancer Treat Res.* 2016;167:107–29.
12. Reed KB, Cook-Norris RH, Brewer JD. The cutaneous manifestations of metastatic malignant melanoma. *Int J Dermatol.* 2012;51(3):243–9.
13. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am.* 2020;100(1):1–12.
14. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The national cancer data base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade. *Cancer.* 1998;83(8):1664–78.
15. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(3):364–80.
16. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo (Brooklyn).* 2014;28(6):1005–12.
17. Newell GR, Sider JG, Kripke ML, Bergfelt L. Incidence of cutaneous melanoma in the united states by histology with special reference to the face. *Cancer Res.* 1988;48(17):5036–41.
18. Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, MacKie RM. Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. *Br J Cancer.* 1996;73(7):940–4.

19. Warycha MA, Christos PJ, Mazumdar M, Darvishian F, Shapiro RL, Berman RS, et al. Changes in the presentation of nodular and superficial spreading melanomas over 35 years. *Cancer*. 2008;113(12):3341–8.
20. Duncan LMD. The Classification of Cutaneous Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(3):501–13.
21. Rubegni P, Lamberti A, Mandato F, Perotti R, Fimiani M. Dermoscopic patterns of cutaneous melanoma metastases. *Int J Dermatol*. 2014;53(4):404–12.
22. Conejo-Mir JS, Camacho F, Ríos JJ, González-Cámpora R. Epidermotropic metastasis coexisting with multiple primary cutaneous malignant melanomas. *Dermatology*. 1993;186(2):149–52.
23. Plaza JA, Torres-Cabala C, Evans H, Diwan HA, Suster S, Prieto VG. Cutaneous metastases of malignant melanoma: A clinicopathologic study of 192 cases with emphasis on the morphologic spectrum. *Am J Dermatopathol*. 2010;32(2):129–36.
24. Matsumoto M, Secrest A, Anderson A, Saul MI, Ho J, Kirkwood JM, et al. Estimating the cost of skin cancer detection by dermatology providers in a large health care system. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(4):701-709.e1.
25. Pandit AS, Geiger EJ, Ariyan S, Narayan D, Choi JN. Using topical imiquimod for the management of positive in situ margins after melanoma resection. *Cancer Med*. 2015;4(4):507–12.
26. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):45–60.
27. Mark Elwood J, Jopson J. Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997;73(2):198–203.
28. Green A, Autier P, Boniol M, Boyle P, Doré JF, Gandini S, et al. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*. 2007;120(5):1116–22.
29. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol*. 2009;10(8):751–2.
30. Colantonio S, Bracken MB, Beecker J. The association of indoor tanning and melanoma in adults: Systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(5):847-857.e18.
31. Gery P, Guy Jr, PhD, MPH, Yuanhui Zhang, PhD, Donatus U. Ekwueme, PhD, MS SH, Rim, PhD, MPH, and Meg Watson M. The potential impact of reducing indoor tanning on melanoma prevention and treatment costs in the United States: An economic analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(2):226–33.
32. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H, Corona R. Cutaneous Melanomas Associated with Nevi. *Arch Dermatol*. 2003;139(12):1620–4.
33. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):28–44.
34. Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Franceschi S, Green A, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. *Int J Cancer*.

- 1995;62(4):377–81.
35. Stam-Posthuma JJ, Duinen C van, Scheffer E, Vink J, Bergman W. Multiple primary melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(1):22–7.
 36. Veierød Bragelien M, Weiderpass E, Thörn M, Hansson J, Lund E, Armstrong B, et al. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(20):1530–8.
 37. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer*. 2005;116(1):144–9.
 38. Green AC, Olsen CM. Increased risk of melanoma in organ transplant recipients: Systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(8):923–7.
 39. Ascha M, Ascha MS, Tanenbaum J, Bordeaux JS. Risk factors for melanoma in renal transplant recipients. *JAMA Dermatology*. 2017;153(11):1130–6.
 40. Kucher C, Zhang PJ, Pasha T, Elenitsas R, Wu H, Ming ME, et al. Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevi. *Am J Dermatopathol*. 2004;26(6):452–7.
 41. Pollitt RA, Geller AC, Brooks DR, Johnson TM, Park ER, Swetter SM. Efficacy of skin self-examination practices for early melanoma detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(11):3018–23.
 42. Tsao H, Olazagasti JM, Cordero KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(4):717–23.
 43. Robinson JK, Turrisi R. Skills Training to Learn Discrimination of ABCDE Criteria by Those at Risk of Developing Melanoma. *JAMA Dermatology*. 2006;142.
 44. Thomas, L.; Tranchand, P.; Berard F et. al. Semiological Value of ABCDE Criteria in the Diagnosis of. *Dermatology*. 1998;02:11–7.
 45. MacKie RM. Clinical recognition of early invasive malignant melanoma. *Br Med J*. 1990;301(6759):1005–6.
 46. Hofmann-Wellenhof R, Wurm EMT, Ahlgrimm-Siess V, Richtig E, Koller S, Smolle J, et al. Reflectance Confocal Microscopy-State-of-Art and Research Overview. *Semin Cutan Med Surg*. 2009;28(3):172–9.
 47. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009;20(SUPPL. 4):1–7.
 48. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics , 2009 BOTH SEXES FEMALE BOTH SEXES ESTIMATED DEATHS. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(4):1–25.
 49. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7–34.
 50. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.

51. Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet.* 2009;126(4):499–510.
52. Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JWW. Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer.* 2008;44(10):1345–89.
53. Instituto Nacional de Estadística IP. *Causas de Morte.* 2017.
54. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199–206.
55. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. 2015;(1):516–24.
56. Motofei IG. Malignant Melanoma: Autoimmunity and Supracellular Messaging as New Therapeutic Approaches. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(6).
57. Lee C, Collichio F, Ollila D, Moschos S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol.* 2013;31(2):141–7.
58. Serrano-Ortega S, Ruiz-Villaverde R, Blasco-Melguizo J, Linares Solano J. Cutaneous melanoma extirpated with insufficient surgical margins. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2003;17(3):296–8.
59. Wheatley K, Wilson JS, Gaunt P, Marsden JR. Surgical excision margins in primary cutaneous melanoma: A meta-analysis and Bayesian probability evaluation. *Cancer Treat Rev.* 2016;42:73–81.
60. Pavri SN, Clune J, Ariyan S, Narayan D. Malignant melanoma: Beyond the basics. *Plast Reconstr Surg.* 2016;138(2):330e-340e.
61. Knackstedt T, Knackstedt RW, Couto R, Gastman B. Malignant melanoma: Diagnostic and management update. *Plast Reconstr Surg.* 2018;142(2):202E-216E.
62. MacKenzie Ross AD, Haydu LE, Quinn MJ, Saw RPM, Shannon KF, Spillane AJ, et al. The Association Between Excision Margins and Local Recurrence in 11,290 Thin (T1) Primary Cutaneous Melanomas: A Case–Control Study. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(4):1082–9.
63. Bradish JR, Cheng L. Molecular pathology of malignant melanoma: Changing the clinical practice paradigm toward a personalized approach. *Hum Pathol.* 2014;45(7):1315–26.
64. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): A randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):522–30.
65. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KSM. A brief history of melanoma. *Melanoma Res.* 2012;22(2):114–22.
66. Yang AS, Chapman PB. The History and Future of Chemotherapy for Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(3):583–97.
67. Kalal BS, Upadhyaya D, Pai VR. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. *Oncol Rev.* 2017;11(1):19–25.

68. Moitra K. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
69. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):219–34.
70. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7369–75.
71. Mannervik B, Castro VM, Danielson UH, Tahir MK, Hansson J, Ringborg U. Expression of class Pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells. *Carcinogenesis.* 1987;8(12):1929–32.
72. Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer.* 2000;82(2):488–91.
73. Fu D, Calvo J a, Samson LD. SERIES: Genomic instability in cancer Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer.* 2013;12(2):104–20.
74. Rüniger TM, Emmert S, Schadendorf D, Diem C, Epe B, Hellfritsch D. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J Invest Dermatol.* 2000;114(1):34–9.
75. Helmbach H, Kern MA, Rossmann E, Renz K, Kissel C, Gschwendt B, et al. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J Invest Dermatol.* 2002;118(6):923–32.
76. Koetz-ploch L, Hanniford D, Dolgalev I, Sokolova E, Díaz-martínez M, Bernstein E, et al. MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway Lisa. 2017;30(3):328–38.
77. Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *Euro J Cancer Prev.* 2003;12(2):93–100.
78. Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. 1998;8:197–203.
79. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 2001;409(6817):207–11.
80. Singh BP, Salama AKS. Updates in therapy for advanced melanoma. *Cancers (Basel).* 2016;8(1):1–15.
81. Malissen N, Grob JJ. Metastatic Melanoma: Recent Therapeutic Progress and Future Perspectives. *Drugs.* 2018;78(12):1197–209.
82. Carreau NA, Pavlick AC. Nivolumab and ipilimumab: immunotherapy for Treatment of Malignant Melanoma. 2018;
83. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507–16.
84. Seth R, Messersmith H, Kaur V, Kirkwood JM, Kudchadkar R, McQuade JL, et al. Systemic therapy for melanoma: ASCO guideline. *J Clin Oncol.* 2020;38(33):3947–70.

85. Zhu Z, Liu W, Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma-Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;99:91–9.
86. Pulte D, Weberpals J, Jansen L, Brenner H. Changes in population-level survival for advanced solid malignancies with new treatment options in the second decade of the 21st century. *Cancer.* 2019;125(15):2656–65.
87. Hodi, F. Stephen, Steven J., O’Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, Caroline Robert, Dirk Schadendorf, Jessica C. Hassel, Wallace Akerley, Alfons J.M. van den Eertwegh, Jose Lutzky, Paul Lorigan, Juli and WJU. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711–723.
88. Duraiswamy, J. Kaluza, K.M., Freeman, G. J. C. Mechanisms regulating immune activation in cancer progression have been extensively investigated. *Cancer Res.* 2013;73(12):3591–603.
89. Lookingbill DP, Spangler N, Helm KF. Cutaneous metastases in patients with metastatic carcinoma: A retrospective study of 4020 patients. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29(2):228–36.
90. Feng Y, Masson E, Dai D, Parker SM, Berman D, Roy A. Model-based clinical pharmacology profiling of ipilimumab in patients with advanced melanoma. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;78(1):106–17.
91. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027–34.
92. Kammula, U.S., White, D.E., Rosenberg SA. Trends in the safety of high dosebolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer.* 1998;83:797–805.
93. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows. *Science (80-).* 1976;193:1007–8.
94. Saranga-Perry V, Ambe C, Zager JS, Kudchadkar RR. Recent developments in the medical and surgical treatment of melanoma. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(3):171–85.
95. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: An overview. *Oncology.* 2009;23(6):488–96.
96. Atkins BMB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2105–16.
97. Marabondo S, Kaufman HL. High-dose interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma: safety considerations and future directions. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(12):1347–57.
98. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol.* 2018;8(MAR):1–14.
99. Siedek V, Schuh T, Wollenberg A. Leser-Trelat sign in metastasized malignant melanoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2009;266(2):297–9.

100. Li J, Gu J. Efficacy and safety of ipilimumab for treating advanced melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Pharm Ther.* 2019;44(3):420–9.
101. Shaw HM, Nathan PD. Vemurafenib in melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(5):513–22.
102. A.M.M. Eggermont, V. Chiaro-Sileni, J.-J. Grob, R. Dummer, J.D. Wolchok, H. Schmidt, O. Hamid, C. Robert, P.A. Ascierto, J.M. Richards, C. Lebbé, V. Ferraresi, M. Smylie, J.S. Weber, M. Maio, L. Bastholt, L. Mortier, L. Thomas, S. Tahir, A. Hauschild, J. and AT. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1845–55.
103. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2517–26.
104. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2691–7.
105. Fellne C. Ipilimumab (Yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: Serious side effects and a hefty price tag may limit its use. *P T.* 2012;37(9):503–12.
106. Wheatley K, Ives N, Hancock B, Gore M, Eggermont A, Suci S. Does adjuvant interferon- α for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(4):241–52.
107. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(7):493–501.
108. O’Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V, Gajewski TF, Pehamberger H, Bondarenko IN, et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: A multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol.* 2010;21(8):1712–7.
109. Eggermont AMM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2014;383(9919):816–27.
110. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):155–64.
111. Thompson JA. New NCCN guidelines: Recognition and management of immunotherapy-related toxicity. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2018;16(5S):594–6.
112. J.D. Wolchok, V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, P. Rutkowski, J.-J. Grob, C.L. Cowey, C.D. Lao, J. Wagstaff, D. Schadendorf, P.F. Ferrucci, M. Smylie, R. Dummer, A. Hill, D. Hogg, J. Haanen, M.S. Carlino, O. Bechter, M. Maio, I. Marquez-Rodas, M. Guidoboni and JL. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2017;377(14):1345–56.
113. Wongchenko MJ, Ribas A, Dréno B, Ascierto PA, McArthur GA, Gallo JD, et al. Association of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression with treatment outcomes in patients with BRAF mutation-positive melanoma treated with vemurafenib or cobimetinib combined with vemurafenib. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;31(4):516–22.

114. Obeid JM, Erdag G, Smolkin ME, Deacon DH, Patterson JW, Chen L, et al. PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome. *Oncoimmunology*. 2016;5(11):1–12.
115. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*. 2006;203(10):2223–7.
116. He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep*. 2015;5(July):1–9.
117. Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(4):319–26.
118. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521–32.
119. Bajaj G, Wang X, Agrawal S, Gupta M, Roy A, Feng Y. Model-Based Population Pharmacokinetic Analysis of Nivolumab in Patients with Solid Tumors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2017;6(1):58–66.
120. Topalian, Suzanne L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *Eur Urol*. 2012;366(26):2443–54.
121. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1020–30.
122. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(4):375–84.
123. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation . *N Engl J Med*. 2015;372(4):320–30.
124. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: A randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. 2014;384(9948):1109–17.
125. Dummer, R., Daud, A., Puzanov, I., Hamid, O., Schadendorf, D., Robert C. A randomized controlled comparison of pembrolizumab and chemotherapy in patients with ipilimumab-refractory melanoma. *J Transl Med*. 2015;(13):2062.
126. Menzer C, Menzies AM, Carlino MS, Reijers I, Groen EJ, Eigentler T, et al. Targeted therapy in advanced melanoma with rare BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2019;37(33):3142–51.
127. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–54.
128. The Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681–96.
129. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(11):875–85.

130. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(17):2823–30.
131. Flaherty KT, Puzanov I, Kim K., Ribas A, McArthur GA, Sosman J., et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809–19.
132. Hauschild A, Grob JJ, Demidov L V., Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;380(9839):358–65.
133. Egberts F, Kaehler KC, Brasch J, Schwarz T, Cerroni L, Hauschild A. Multiple skin metastases of malignant melanoma with unusual clinical and histopathologic features in an immunosuppressed patient. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(5):880–4.
134. Chapman PB, Kim MJ, Ph D, Hayward R, Martin M, Ph D, et al. RAS Mutations in Cutaneous Squamous-Cell Carcinomas in Patients Treated with BRAF Inhibitors. *New Engl J Med.* 2012;207–15.
135. Larkin J, Del Vecchio M, Ascierto PA, Krajsova I, Schachter J, Neyns B, et al. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutated metastatic melanoma: An open-label, multicentre, safety study. *Lancet Oncol.* 2014;15(4):436–44.
136. Long G V., Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/ K-mutant melanoma: Long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1631–9.
137. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med.* 2015;372(1):30–9.
138. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1867–76.
139. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(5):603–15.
140. Shirley M. Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs [Internet].* 2018;78(12):1277–84. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0963-x>
141. Hussar DA. New drugs - Binimetinib plus encorafenib. *Aust Prescr.* 2019;42(5):168–9.
142. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(10):1315–27.
143. Trojaniello C, Festino L, Vanella V, Ascierto PA. Encorafenib in combination with binimetinib for unresectable or metastatic melanoma with BRAF mutations. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019;12(3):259–66.
144. Gogas HJ, Flaherty KT, Dummer R, Ascierto PA, Arance A, Mandala M, et al.

- Adverse events associated with encorafenib plus binimetinib in the COLUMBUS study: incidence, course and management. *Eur J Cancer*. 2019;119(August):97–106.
145. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* (80-). 2015;348(6230):62–8.
 146. Rosenberg SA. Raising the Bar: The Curative Potential of Human Cancer Immunotherapy. *Sci Transl Med*. 2012;4(127).
 147. Rosenberg, S. A., Yang JC et al. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4550–7.
 148. Phan, G. Q., Rosenberg SA. Adoptive Cell Transfer for Patients With Metastatic Melanoma: The Potential and Promise of Cancer Immunotherapy. *Cancer Control*. 2013;20(4):289–97.
 149. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Jacques Grob J, Lao CD, Schadendorf D, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma Corresponding authors. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23–34.
 150. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4275–80.
 151. Long G V., Atkinson V, Cebon JS, Jameson MB, Fitzharris BM, McNeil CM, et al. Standard-dose pembrolizumab in combination with reduced-dose ipilimumab for patients with advanced melanoma (KEYNOTE-029): an open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1202–10.
 152. Michael A. Postow, Jason Chesney, Anna C. Pavlick, Caroline Robert, Kenneth Grossmann, David McDermott, Gerald P. Linette, Nicolas Meyer, Jeffrey K. Giguere, Sanjiv S. Agarwala, Montaser Shaheen, Marc S. Ernstoff, David Minor, April K. Salama, Matthew Tay and FSH. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2006–17.
 153. Postow MA. Managing Immune Checkpoint-Blocking Antibody Side Effects. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2015;(35):76–83.
 154. Kato, Y., Otsuka, A., Miyachi, Y., Kabashima K. Exacerbation of psoriasis vulgaris during nivolumab for oral mucosal melanoma. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2016;30(10):e88–91.
 155. Chae YK, Chiec L, Mohindra N, Gentzler R, Patel J, Giles F. A case of pembrolizumab-induced type-1 diabetes mellitus and discussion of immune checkpoint inhibitor-induced type 1 diabetes. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(1):25–32.
 156. Della Vittoria Scarpati G, Fusciello C, Perri F, Sabbatino F, Ferrone S, Carlomagno C, et al. Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: Management of adverse events. *Onco Targets Ther*. 2014;7:203–9.
 157. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, Angeletti D, Fiore M, Marchetti P, et al. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *J Immunol Res*. 2020;2020.
 158. Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, et al. LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res*. 2014;74(13):3418–28.

159. Fröhlich A, Sirokay J, Fietz S, Vogt TJ, Dietrich J, Zarbl R, et al. Molecular, clinicopathological, and immune correlates of LAG3 promoter DNA methylation in melanoma. *EBioMedicine*. 2020;59:1–15.
160. Veitonmäki N, Thagesson M, Werchau D, Hägerbrand K, Smedenfors K, Månsson-Kvarnhammar A, et al. The CTLA-4 x OX40 bispecific antibody ATOR-1015 induces anti-tumor effects through tumor-directed immune activation. 2019;7:103.
161. Peng W, Williams LJ, Xu C, Melendez B, Mckenzie JA, Chen Y, et al. Anti-OX40 antibody directly enhances the function of tumor- reactive CD8+ T cells and synergizes with PI3K β inhibition in PTEN loss melanoma. 2019;25(21):6406–16.
162. Puzanov I, Milhem MM, Minor D, Hamid O, Li A, Chen L, et al. Talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab in previously untreated, unresectable stage IIIB-IV melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(22):2619–26.
163. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(3):604–11.