



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Causes de la resistència al tractament amb inhibidors
de BRAF+MEK en el melanoma cutani mutat en BRAF:
Identificació de biomarcadors per optimitzar la selecció
terapèutica en la malaltia avançada**

Carme Solé Blanch



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Causes de la resistència al tractament amb inhibidors de BRAF+MEK en el melanoma cutani mutat en BRAF: Identificació de biomarcadors per optimitzar la selecció terapèutica en la malaltia avançada

Carme Solé Blanch

**Tesi doctoral
2024**

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Programa de Doctorat en Biomedicina

**Causes de la resistència al tractament amb inhibidors
de BRAF+MEK en el melanoma cutani mutat en BRAF:
Identificació de biomarcadors per optimitzar la selecció
terapèutica en la malaltia avançada**

Memòria presentada per

Carme Solé Blanch

Per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada al Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP)

Doctoranda



Carme Solé Blanch

Directora

Tutora

Anna Martínez-Cardús

Sonia Vanina Forcales Fernández

Barcelona, 18 de setembre de 2024



I, a vegades, contra tot pronòstic
una gran bestiesa capgira allò que creiem lògic,
tot fent evident,
que per un moment,
ens en sortim.

Manel

A la mare i al pare,

Agraïments

Aquesta tesi no és únicament meva, també és fruit de la feina, suggeriments, propostes, ajuda, suport, encoratjament i confiança d'altres persones, a qui m'agradaria agrair.

En primer lloc a l'**Anna**. Per haver-me ensenyat tant, per haver cregut en mi des de l'inici, per sempre trobar una solució bona a tot, per l'afinitat i per la confiança que, malgrat els contratemps, tot sortirà bé. Ha sigut un plaer tenir-te de mentora.

Als oncòlegs **José Luis Manzano** i **Sofia España**, pel suport referent a la clínica i per sempre estar disposats a donar un cop de mà. A l'equip de melanoma i els seus col·laboradors: Aram Boada, Ariadna Quer, Maria Gonzalez-Cao, Sonia Segura, Anna Esteve-Codina i Tomàs Montserrat. A l'equip del SOM.

A la meva tutora **Sonia F**, per sempre estar present i pels bons suggeriments.

A la **Roser**, per ajudar-me a millorar el meu català.

Als **pacients**, que gràcies a les seves mostres ha sigut possible fer aquest estudi.

Als meus companys del lab, sense ells, res d'això hauria sigut possible:

A la **Crist**, que l'he sentit com família pràcticament des del primer moment que vaig posar un peu a Badalona. Per ajudar-me sempre incondicionalment, pels *papitus*, pels "de fàcil a difícil", pels "vinc a apretar-te", per sempre buscar una solució dins i fora del lab i per la seva amistat. A la **Cris**, per ser la meva referent des que tan sols era una *pollito* i per haver-me acompanyat en el meu creixement personal i laboral al llarg de tots aquests anys. A la **Sara C**, per la seva vitalitat, ajuda incondicional i pel suport i empatia en moments complicats. A la **Carla** per tenir les idees tan clares, per la complicitat i per ensenyar-me tantes coses (malgrat l'energia de germana petita). A la **Marta C**, per ser la pitonissa dels bons consells, per no poder parar de riure al seu costat i per sempre ser una còmplice per anar a dinar. A la **Tania**, per ser tan transparent i sincera. Al **Ferran**, per totes les dades útils que he utilitzat dins i fora d'aquesta tesi i per la complicitat a l'altra banda de l'escriptori. A l'**Adrià**, per tots els consells que m'han ajudat a construir aquest projecte i per fer-me decidir quan no vull fer-ho. A la **Marta D**, per l'acompanyament, les cures i els riures. A la **Maria F**, per ser tan dolça i empàtica i per fer que la gent del seu voltant estigui bé. A la **Maria S**, per les bones propostes. A l'**Eva** pels bons consells.

A la gent del IGTP: Monguió, Daina, Maria, Bea, Mar, Joan, Edu, Laura, Sara B, Arola, Oskar, Raquel, Montse, Eli, Helena i molts altres que segurament em deixo.

A les meves grans amistats: a la **Carla** per sempre tenir un consell, per l'inconformisme i per ser la meva millor amiga des que tinc ús de raó. A la **Tere** per ser la meva companya d'aventures, la millor cordada dins i fora la paret i per ajudar-me a desconnectar d'aquesta tesi amb les cerveses després de la feina i la muntanya la resta del temps. A la resta d'amistats, en especial les de Dominiques, a la **Granell** i la **Mònica** per fer que sempre senti que puc comptar amb elles, a la **Mercè** per ser-hi tot i la distància, i a les de la Uni. Al **Javi** per ser tan bon amic.

Menció especial a la **Marta Clos**, que ha sigut literalment la meva família durant aquesta etapa. Gràcies pel suport incondicional, per sempre intentar treure el costat positiu, per apuntar-se a tot, per ser la millor *partner in crime*, per l'escalda, per les *Catalunya experience*, per les birres i els patxarans. Per escoltar les meves tures i sempre tenir un bon consell. Gràcies per fer-me sentir queestic a casa.

A la meva família. Als **iaios**, per ensenyar-me el valor de la família. A la padrina, tiets, cosins i la meva germana **Maria**.

I per sobre de tot, als meus **parens**, per ser el meu far en l'horitzó (què faria sense vosaltres!). A la **mare** per posar les comes on toquen i al **pare** per dibuixar 500 versions de la portada.

Índex

Agraïments	9
Abreviacions	15
Abstract	19
Resum	23
Introducció	27
1. El melanoma cutani	29
1.1. Incidència i mortalitat del melanoma cutani	29
1.2. Causes i factors de risc.....	30
1.3. Factors de pronòstic	31
1.4. Patogènesi i alteracions moleculars en el melanoma cutani.....	33
1.4.1. Carcinogènesi: fases i mutacions <i>driver</i>	33
1.4.2. Classificació genòmica del melanoma cutani	35
1.4.3. Classificació transcriptòmica	37
1.5. Diagnòstic i estadificació.....	39
2. El tractament del melanoma cutani	41
2.1. Els inhibidors de BRAF i MEK	42
2.2. Els inhibidors dels punts de control del sistema immune (ICI)	44
2.3. Tractament de la malaltia localitzada o localment avançada.....	45
2.3.1. Resecció quirúrgica.....	45
2.3.2. Tractament neoadjuvant.....	46
2.3.3. Tractament adjuvant	46
2.4. Tractament de la malaltia metastàtica	47
2.4.1. Opcions de tractament en primera línia	47
3. La mutació de <i>BRAF</i> i la via de senyalització de les MAPK	52
3.1. Mutació de <i>BRAF</i> i impacte en Pancancer	52
3.2. Estructura de la mutació de <i>BRAF</i>	52
3.3. Via de senyalització de les MAPK.....	53
4. Mecanismes de resistència a inhibidors de la via de les MAPK	54
4.1. Mecanismes moleculars implicats en la resistència terapèutica.....	54
4.2. Tipus de resistència a la teràpia.....	56

4.2.1. Resistència intrínseca o primària	56
4.2.2. Resistència adaptativa o fase de tolerància	58
4.2.3. Resistència adquirida estable	61
5. Mecanismes de resistència als ICI	64
Hipòtesis	67
Objectius.....	71
Objectius Estudi I	73
Objectius Estudi II	73
Materials i mètodes.....	75
1. Estudi I.....	77
1.1. Inclusió de pacients i generació de la base de dades	77
1.2. Processament de les mostres tumorals FFPE	79
1.2.1. Desparafinització i digestió dels teixits tumorals inclosos en parafina	79
1.2.2. Extracció d'ARN procedent de teixits inclosos en parafina	79
1.3. Anàlisi d'expressió gènica per la tècnica de Nanostring	79
1.3.1 Anàlisi d'expressió usant el nCounter® PanCancer IO 360™ Panel	79
1.3.2. Anàlisis de dades	80
1.3.3. Selecció dels gens candidats	81
1.3.4. Correlació estadística dels gens candidats amb les variables clíniques	81
1.4. Validació de l'expressió dels gens candidats en la cohort retrospectiva i estudi en la cohort de validació per la tècnica de RT-qPCR.....	82
1.4.1. Retrotranscripció.....	82
1.4.2. Anàlisi d'expressió de candidats per RT-qPCR.....	82
2. Estudi II.....	85
2.1. Generació de línies cel·lulars amb resistència adquirida a la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK	85
2.2. Assajos de viabilitat cel·lular.....	86
2.3. Anàlisi d'expressió gènica per cèl·lula individual o <i>scRNAseq</i>	87
2.3.1. Preparació de les línies cel·lulars i anàlisi d'expressió gènica	87
2.3.2. Anàlisi bioinformàtica i estadística de dades	87
2.3.3. Criteris de selecció de biomarcadors de resistència adquirida com a potencials dianes terapèutiques	88
2.4. Estudis funcionals <i>in vitro</i> per modulació del gen candidat	89
2.4.1. Extracció i quantificació d'ARN en línies cel·lulars	89

2.4.2. Extracció i quantificació de proteïna de les línies cel·lulars	89
2.4.3. Anàlisi de l'expressió gènica per la tècnica de RT-qPCR.....	89
2.4.4. Anàlisi de l'expressió de proteïna per la tècnica de Western Blot.....	90
2.4.5. Inhibició de l'expressió gènica utilitzant la tècnica de shRNA.....	91
2.4.6. Anàlisi de la reversió de resistència a inhibidors de BRAF+MEK	93
2.4.7. Anàlisi de la proliferació cel·lular	93
2.4.8. Anàlisi de la capacitat de migració cel·lular	94
2.4.9. Anàlisi de la capacitat d'invasió cel·lular	95
Resultats	97
Resultats Estudi I	99
1. Inclusió dels pacients i característiques de la cohort retrospectiva	99
1.1. Característiques clíniques de la cohort retrospectiva	99
1.2. Anàlisi de la supervivència en funció de les variables clíniques i histopatològiques de la cohort retrospectiva.....	103
2. Anàlisi dels gens diferencialment expressats segons el benefici clínic en la cohort retrospectiva estratificada per tractaments: inhibidors de BRAF+MEK i immunoteràpia.....	104
2.1. Identificació de gens potencials factors pronòstic en ambdues cohorts de tractament	106
2.2. Identificació de biomarcadors com a potencials factors predictius d'expressió amb valor oposat entre ambdues cohorts de tractament per a la selecció de la millor opció terapèutica.....	107
2.3. Validació de la capacitat predictiva de selecció de la millor opció terapèutica dels 3 biomarcadors en forma de signatura	110
3. Validació de la signatura de 3 biomarcadors en una cohort independent de pacients amb melanoma <i>BRAF</i> mutat tractats amb inhibidors de BRAF+MEK o immunoteràpia	113
3.1. Inclusió dels pacients i característiques de la cohort prospectiva	113
3.2. Validació tècnica de l'anàlisi de biomarcadors per una tècnica d'anàlisi d'expressió alternativa: Nanostring vs RT-qPCR.....	114
3.3. <i>CCL21</i> , <i>GHR</i> i <i>CXCL8</i> en la cohort prospectiva	115
Resultats Estudi II	121
1. Generació de línies cel·lulars de melanoma cutani amb resistència adquirida a la combinació de dabrafenib + trametinib.....	121
2. Anàlisi mitjançant la tècnica de <i>scRNAseq</i> de les alteracions transcriptòmiques involucrades en l'adquisició de resistència als inhibidors de BRAF+MEK en el model <i>in vitro</i> de resistència adquirida	122
3. Anàlisi integral de dades per a dilucidar els mecanismes adaptatius i de plasticitat cel·lular implicats en l'adquisició de resistència a teràpia dirigida i la selecció dels biomarcadors més robustos per a futurs estudis.....	123

3.1. Selecció dels gens candidats associats amb l'adquisició de resistència per l'enriquiment de clons cel·lulars	123
3.2. Anàlisi d'Ontologia Gènica (GO) dels gens seleccionats.....	123
4. Identificació d'un biomarcador implicat en l'adquisició de resistència i validació de la seva funció	128
4.1. Criteris de selecció del candidat més prometedor: SPOCK1	128
4.2. Anàlisi de l'associació de l'expressió de <i>SPOCK1</i> amb els fenotips de plasticitat cel·lular implicats en l'adquisició de resistència en el nostre model	130
4.3. Validació <i>in silico</i> de l'expressió de <i>SPOCK1</i> en altres models cel·lulars de resistència a inhibidors de BRAF+MEK.....	131
4.4. Validació <i>in silico</i> de l'expressió de <i>SPOCK1</i> en cohorts de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK.....	134
5. Estudis funcionals <i>in vitro</i> de la implicació de <i>SPOCK1</i> en l'adquisició de resistència i l'efecte de la seva modulació per revertir-la.....	136
5.1. Validació de l'expressió del marcador <i>SPOCK1</i> en les diferents rèpliques experimentals de resistència per tècniques directes.....	136
5.2. Generació d'un model <i>in vitro</i> d'inhibició de l'expressió de <i>SPOCK1</i> en les cèl·lules resistents IGR37-R1.....	137
5.3. Assajos funcionals <i>in vitro</i> per estudiar el rol de <i>SPOCK1</i> en el fenotip de resistència	138
Discussió	141
Estudi I	143
Estudi II	150
Limitacions del projecte i estratègies futures	156
Conclusions	159
Bibliografia.....	163
Annex	191
Taules suplementàries	193
Figures suplementàries	201
Activitats i publicacions.....	208

Abreviaciones

ADNc	ADN còpia
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	<i>protein kinase B</i>
APC	cèl·lules presentadores d'antigen
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ASR_i	<i>age standardized incidence rates</i>
ASR_m	<i>age standardized mortality rates</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
AXL	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>
BP	processos biològics
CC	components cel·lulars
CCL21	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 21</i>
CCR	carcinoma de cèl·lules renals
CEI	Comitè Ètic d'Investigació
CI	consentiment informat
CPNM	càncer de pulmó no microcític
CSB	<i>cumulative sun damage</i>
CSC	cèl·lules mare tumorals
CXCL8	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i>
DDR	<i>double drug resistant</i>
DEFB134	<i>Defensin Beta 134</i>
DTPPs	<i>Drug-Tolerant Proliferating Persisters</i>
DTPs	cèl·lules persistents tolerants a fàrmac
EGF	factor de creixement epidèrmic
EGFR	receptor de creixement epidèrmic
EMT	transició epiteli-mesènquima
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FC	<i>fold change</i>
FDA	<i>American Food and Drug Agency</i>
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase Million</i>
gADN	ADN genòmic
GCO	<i>Global Cancer Observatory</i>
GEM	Grupo Español Multidisciplinar de Melanoma
GHR	<i>growth hormone receptor</i>
GO	Ontologia Gènica
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HGF	factor de creixement d'hepatòcits
HIF-1α	factor induïble d'hipòxia 1 α
HR	<i>hazard ratio</i>
IC₅₀	la concentració inhibidora 50
ICI	inhibidors dels punts de control del sistema immune
IFN-γ	interferó- γ
ILR	Interval lliure de recaiguda
ITGB8	<i>integrin subunit beta 8</i>
LDH	Lactat deshidrogenasa
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MF	funció molecular
MHC	complex principal d'histocompatibilitat

MITF	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
MRD	Malaltia mínima residual
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCSCs	<i>Neural Crest Stem Cells</i>
NES	<i>normalized enrichment score</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NR	No Resposta
NT	<i>Non-Target</i>
PD	Progressió tumoral
PD1	<i>programmed death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed death-ligand 2</i>
PI3K	<i>phosphoinositol-3-kinase</i>
R	coeficient de correlació
RBD	<i>RAS binding domain</i>
RC	Resposta Completa
RP	Resposta Parcial
RPKM	<i>Reads Per Kilobase Million</i>
RTK	receptors tirosina quinasa
scRNAseq	single cell RNAseq
SD	malaltia estable
SDR	<i>single drug resistant</i>
SG	<i>supervivència global</i>
SLP	<i>supervivència lliure de progressió</i>
SLR	Supervivència lliure de recaiguda
SMC	<i>starved-like melanoma cells</i>
SPOCK1	<i>SPARC/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1</i>
STAG2	antigen estromal 2
STAG3	antigen estromal 3
TCR	receptor de les cèl·lules T
TGFβ	factor de creixement transformador beta
TILs	cèl·lules T infiltrants de tumor
TLP	Temps lliure de progressió
TME	microambient tumoral
Tregs	cèl·lules T reguladores
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
VPN	Valor Predictiu Negatiu
VPP	Valor Predictiu Positiu
WES	<i>whole exome sequencing</i>

Abstract

Cutaneous melanoma accounts for approximately 10% of skin tumors and is recognized as the most aggressive form. At the molecular level, the primary pathway involved in carcinogenesis is driven by mutations that constitutively activate the MAPK pathway, which regulates cell proliferation, growth, and migration. This pathway is often hyperactivated in various cancers. In cutaneous melanoma, the most common mutation occurs in the BRAF gene, found in 52% of patients.

Currently, the main approved systemic therapies for advanced cutaneous melanoma with BRAF mutations include immunotherapy, based on immune checkpoint inhibitors, and targeted therapy, which involves the combination of BRAF and MEK inhibitors. The choice between immunotherapy and targeted therapy remains controversial and is primarily guided by clinical criteria. Identifying biomarkers to optimize the selection of the most appropriate first-line therapeutic option is a crucial objective of this thesis (Study I).

Another significant challenge in these patients is the acquisition of resistance to BRAF+MEK inhibitors. Although genetic clonal selection is undeniably involved, recent studies have highlighted the importance of non-genetic mechanisms of resistance, with phenotype switching being one of the primary mechanisms described. Investigating the transcriptomic mechanisms underlying resistance to targeted therapy, with the aim of identifying new biomarkers that could serve as therapeutic targets after resistance develops, constitutes another key objective of this project (Study II).

Differential gene expression analysis in patients with metastatic BRAF-mutated melanoma, exhibiting varying levels of therapeutic response to targeted therapy or immunotherapy, has identified several candidates (CCL21, GHR, and CXCL8) as potential biomarkers for selecting the most effective personalized therapeutic option. Given the recent changes in melanoma treatment practices during this project, with an increasing number of patients receiving adjuvant immunotherapy, the recruitment of patients in the metastatic setting for the validation cohort was limited. Nonetheless, the biomarker signature was examined in a subgroup of patients treated with adjuvant immunotherapy, with CCL21 emerging as a potential biomarker indicating a high clinical benefit for adjuvant immunotherapy.

In the investigation of non-genetic transcriptional mechanisms associated with acquired resistance to targeted therapy, we observed in an *in vitro* model that the acquisition of resistance involves the depletion of cellular clones expressing genes associated with melanoma differentiation and the enrichment of clones expressing genes characteristic of invasive and mesenchymal-like cell phenotypes. Through the application of various selection criteria, both statistical and bibliographic, the SPOCK1 gene, which was

overexpressed in resistant cells, was identified as a potential biomarker. Functional *in vitro* analyses revealed that inhibiting the SPOCK1 gene did not reverse resistance to BRAF+MEK inhibitors, suggesting that SPOCK1 does not directly contribute to the molecular processes underlying resistance acquisition. However, inhibiting SPOCK1 resulted in reduced cell proliferation, migration, and invasion, supporting its role in the development of a mesenchymal cell phenotype and suggesting its potential as a therapeutic target in the context of resistance to targeted therapy.

Resum

El melanoma cutani representa un 10% dels tumors cutanis però n'és el més agressiu. Molecularment, la via de carcinogènesi principal és la presència de mutacions *drivers* que activen constitutivament la via de les MAPK, la qual regula la proliferació, el creixement i la migració cel·lular i està sovint hiperactivada en diversos tipus de càncer. En el melanoma cutani, la mutació més comuna és en el gen *BRAF*, present en el 52% dels pacients. Actualment, les teràpies sistèmiques principals aprovades per al melanoma cutani avançat *BRAF* mutat inclouen la immunoteràpia, basada en inhibidors dels punts de control del sistema immune, i la teràpia dirigida, que combina inhibidors de les proteïnes BRAF i MEK. La decisió sobre si administrar immunoteràpia o teràpia dirigida és controvertida i actualment es regeix principalment per criteris clínics. És crucial identificar biomarcadors per seleccionar la millor opció terapèutica en primera línia, objectiu principal de l'estudi I d'aquesta tesi.

Una altra complicació important en aquests pacients és la resistència adquirida als inhibidors de BRAF+MEK. Encara que la selecció clonal genètica té un paper inqüestionable, estudis recents corroboren la importància de la resistència no genètica, essent el canvi de fenotip cel·lular un dels principals mecanismes descrits. L'estudi dels mecanismes transcriptòmics que causen resistència a la teràpia dirigida, amb l'objectiu de trobar nous biomarcadors que puguin ser dianes terapèutiques després de l'esmentada teràpia, és un altre dels objectius principals d'aquest projecte (estudi II).

L'anàlisi de l'expressió gènica diferencial entre pacients amb melanoma metastàtic *BRAF* mutat, amb diferents nivells d'eficàcia terapèutica al tractament amb teràpia dirigida o immunoteràpia, ha permès identificar un conjunt de candidats (*CCL21*, *GHR* i *CXCL8*) com a biomarcadors per a la selecció de la millor opció terapèutica personalitzada. Atès que el maneig del tractament del melanoma ha canviat durant el transcurs d'aquest projecte i molts pacients es tracten amb immunoteràpia adjuvant, el nombre de pacients reclutats en el marc metastàtic, amb teixit no prèviament tractat amb immunoteràpia adjuvant, va ser escàs en la cohort de validació, fet que impedia una validació precisa dels biomarcadors en aquest escenari. No obstant això, es va estudiar la signatura en el subgrup de pacients tractats amb immunoteràpia adjuvant i *CCL21* es va postular com un potencial biomarcador d'alt benefici clínic al tractament amb immunoteràpia adjuvant.

En l'estudi dels mecanismes transcripcionals no genètics de resistència adquirida a teràpia dirigida, hem observat, en un model *in vitro*, que durant l'adquisició de resistència es produeix un empobriment de clons cel·lulars amb expressió de gens associats amb la diferenciació del melanoma i, d'altra banda, un enriquiment de clons que expressen

gens característics de fenotips cel·lulars de tipus “invasiu” i “mesenquimal”. Amb diferents criteris de selecció estadístics i bibliogràfics, hem identificat el gen *SPOCK1*, sobreexpressat en les cèl·lules resistents, com a potencial biomarcador. Mitjançant anàlisis funcionals *in vitro*, no hem observat que la inhibició del gen *SPOCK1* revertís la resistència als inhibidors de BRAF+MEK, per tant, no s'ha pogut demostrar la seva implicació directa en els processos moleculars d'adquisició de resistència a la teràpia. Tanmateix, la inhibició del gen sí reduïa la proliferació, la capacitat de migració i la invasió cel·lular, reforçant el paper de *SPOCK1* en el desenvolupament d'un fenotip cel·lular de tipus mesenquimal i posicionant-lo com una potencial diana terapèutica en el context de la resistència a teràpia dirigida.

Introducció

1. EL MELANOMA CUTANI

El melanoma és una malignitat dels melanòcits, els quals es troben al llarg del cos i es caracteritzen per ser cèl·lules productores de pigment. El melanoma cutani és el subtipus de melanoma més comú, ja que suposa un 90-95% del total (1) (**Figura 1**). S'inicia a partir de transformacions de caràcter maligne dels melanòcits que es troben en la capa basal de l'epidermis de la pell, representa un 10% del total dels tumors cutanis i n'és el més agressiu. D'altra banda, els melanomes no cutanis sorgeixen dels melanòcits de l'úvea, les mucoses, els genitals, el tracte gastrointestinal, el sistema urinari o les meninges, entre d'altres localitzacions (2).

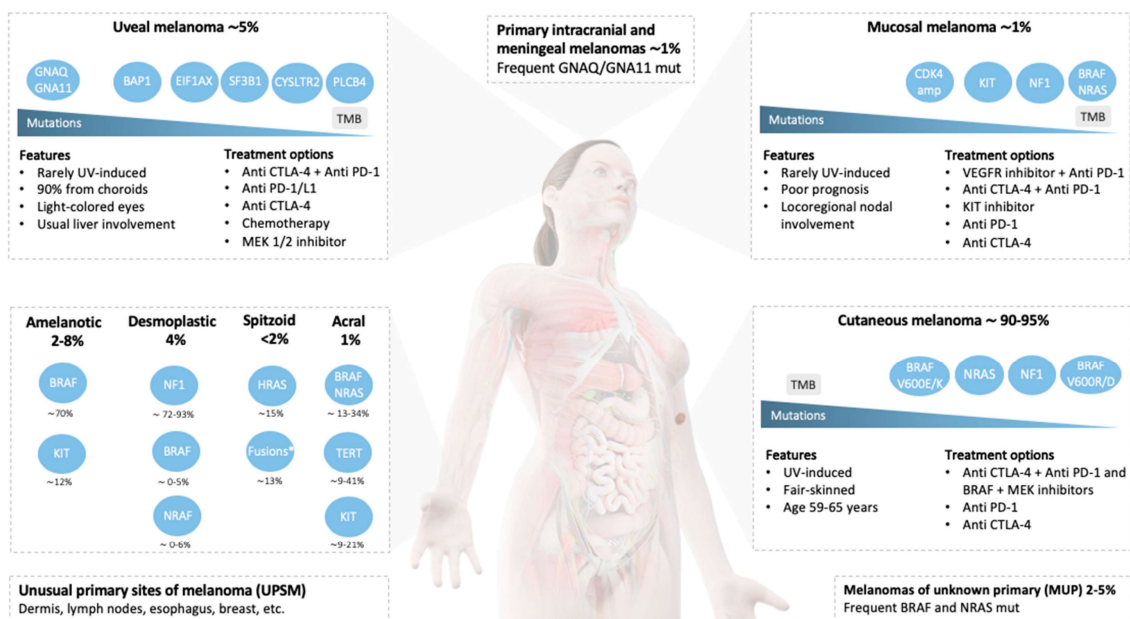


Figura 1. Esquema representatiu dels diferents tipus de melanomes, amb percentatges d'incidència i característiques moleculars i clíniques (1).

1.1. Incidència i mortalitat del melanoma cutani

La incidència del melanoma cutani el 2022, d'acord amb les dades del *Global Cancer Observatory* (GCO), va ser de 331.649 nous casos l'any, arreu del món, en homes i dones. La mortalitat anual d'aquest tipus de càncer va ser de 58.644 casos. La ràtio d'incidència mundial estandarditzada per edat (*age standardized incidence rates (ASR_i)*) del melanoma cutani arriba a una mitjana de 3,2 per cada 100.000 casos i és més elevada en homes (3,7 per cada 100.000 casos) que en dones (2,9 per cada 100.000 casos). Així mateix, la incidència varia geogràficament, Austràlia i Nova Zelanda són els països amb les incidències més elevades, i l'Àsia Sud-central i l'Àfrica Occidental, les més baixes. La ràtio de mortalitat mundial estandarditzada per edat (*age standardized mortality rates (ASR_m)*) del melanoma cutani és de 0,53 per cada 100.000 casos de

mitjana, amb un 2,5 per a cada 100.000 casos la mitjana més elevada, en les zones de major incidència (3) (**Figura 2**).

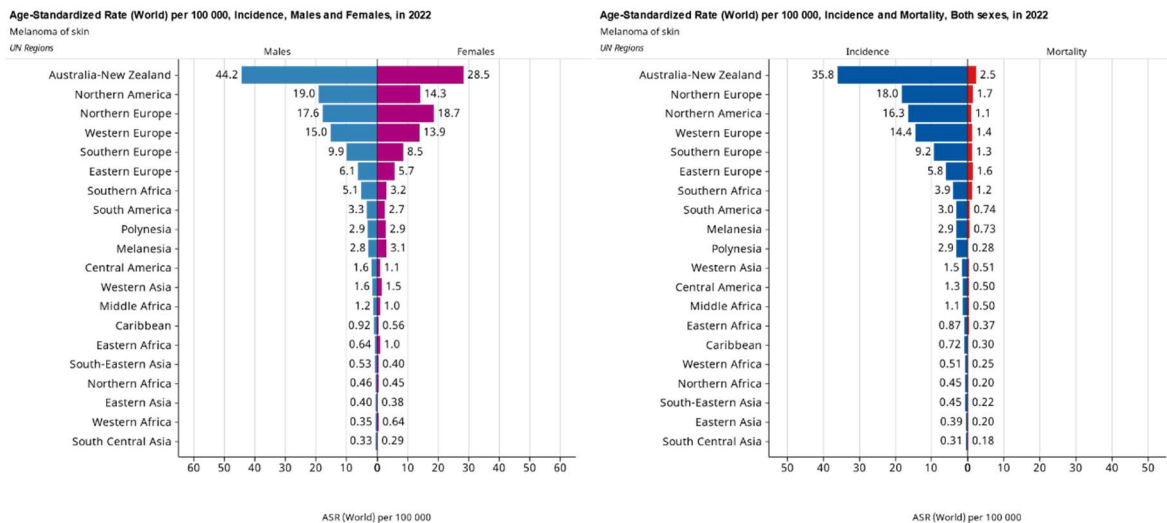


Figura 2. Gràfics representatius a nivell mundial de: ràtio d'incidència estandarditzada per edat (ASRi) del melanoma cutani, estratificada per sexe (esquerra) i comparació de la ASRi amb la ràtio de mortalitat estandarditzada per edat (ASRm) del melanoma cutani (dreta) (3).

1.2. Causes i factors de risc

El principal factor de risc ambiental associat al desenvolupament del melanoma cutani és l'exposició a la radiació de la llum ultraviolada (UV). De fet, l'espectre UV-B, el qual comprèn longituds d'ona d'entre 290 i 320 nm, és el més carcinogen per a la pell (2,4). Aquestes longituds d'ona són absorbides per les cèl·lules de la pell i hi interaccionen mitjançant l'estrès oxidatiu, el qual altera els melanòcits (5,6). A més a més, també hi ha un dany indirecte d'aquesta radiació que dona lloc al mal funcionament de la reparació de l'ADN, fet que provoca l'aparició de noves mutacions que indueixen la carcinogènesi, transformant cèl·lules normals en cèl·lules tumorals (7,8).

D'altra banda, hi ha altres factors de risc relacionats amb les característiques pròpies de l'individu, com el fet de tenir nevus pigmentats, factors genètics com el color de la pell, o un historial familiar de melanoma (9,10). Aproximadament un 25% dels melanomes cutanis es desenvolupen a partir d'un nevus, i el risc augmenta depenent no només del nombre sinó també de la mida i del tipus (4,11,12). Pel que fa al tipus de fenotip de la pell, les persones que tenen la pell clara, amb cabell pèl-roig o ros, la cara pigada i els ulls clars tenen més risc a l'hora de desenvolupar melanoma cutani, ja que són més sensibles a la llum ultraviolada (2). Finalment, aproximadament el 7-15% dels casos de melanoma estan relacionats amb un historial familiar (13). La mutació en el gen *CDKN2A* és la més comuna en les famílies que tenen un historial per melanoma cutani i, de manera menys freqüent, la mutació en el gen que codifica per la proteïna CDK4 (14–17).

1.3. Factors de pronòstic

La prognosi del melanoma cutani està associada a paràmetres clínics, histopatològics, demogràfics i moleculars. Els factors de pronòstic que han mostrat més valor són els que s'han anat integrant al sistema d'estadificació del melanoma, el TNM de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* 8a edició (18). De fet, a conseqüència d'això, l'estadificació del tumor és el principal factor de pronòstic del melanoma (l'estadificació del melanoma cutani està explicat més extensament a l'apartat 1.5).

1.3.1. Paràmetres clínics i histopatològics

Pel que fa al melanoma cutani localitzat (estadi I i II), els dos factors de pronòstic més importants són el gruix de Breslow i la ulceració; quan hi ha disseminació ganglionar (estadi III) els factors de pronòstics més rellevants són el número de ganglis afectats, la mida de les metàstasis ganglionars i la seva localització. Finalment, els principals factors de pronòstic en fase metastàtica (estadi IV) són la localització de les metàstasis i els nivells de lactat deshidrogenasa (LDH) en sang (19).

Melanoma localitzat (estadi I i II)

➤ Gruix de Breslow

Alexander Breslow, l'any 1970, va proposar un mètode que es basava en mesurar la profunditat en mil·límetres de la infiltració tumoral de les diferents capes de la pell (20). Segons això, el gruix de Breslow es classifica en els següents estadis:

- Estadi I: $\leq 0,75$ mm (estadi I AJCC)
- Estadi II: 0.76-1.5 mm (estadi II AJCC)
- Estadi III: 1.51-2.25 mm (estadi III AJCC)
- Estadi IV: 2.26-3 mm (estadi IV AJCC)
- Estadi V: >3 mm

Breslow va demostrar que els melanomes de menys gruix tenien millor pronòstic i menys risc de metàstasi, ja que permet la predicció de quins havien de ser ressecats (20). Diversos estudis, inclòs el que va donar lloc a la base de dades de l'AJCC, han corroborat l'índex de Breslow com el factor de pronòstic més important per al melanoma cutani localitzat (20–23).

➤ La ulceració

La ulceració es defineix com l'absència del gruix total d'una epidermis intacta sobre qualsevol porció del tumor primari amb una reacció inflamatòria de l'hoste associada en l'observació microscòpica (24) i es relaciona amb més agressivitat clínica i pitjor supervivència del pacient (25,26).

➤ **Altres paràmetres histopatològics**

La localització del tumor primari es considera un factor de pronòstic independent ja que es va observar que el risc de mort en els pacients amb melanoma cutani es duplicava quan el tenien localitzat en zones axil·lars o de cap i coll (27). Una altra mesura que s'utilitza per predir la prognosi en la peça tumoral de melanoma cutani és el nivell de Clark, que es tracta d'una classificació basada en la penetració histològica del tumor (28):

- Nivell 1: les cèl·lules de melanoma només es troben a l'epidermis.
- Nivell 2: algunes cèl·lules de melanoma han envaït la dermis papil·lar.
- Nivell 3: les cèl·lules de melanoma s'han expandit per la dermis papil·lar.
- Nivell 4: les cèl·lules de melanoma han envaït la dermis reticular.
- Nivell 5: les cèl·lules de melanoma han envaït el greix subcutani.

Posteriorment, es va descriure que una alta proliferació de les cèl·lules tumorals, calculada com el nombre de cèl·lules que es troben en mitosi en una certa quantitat de teixit (índex mitòtic), tenia també rellevància pronòstica (29,30). Alguns estudis també han descrit l'absència de limfòcits infiltrants en el tumor (TILs) com un factor de pronòstic independent de l'aparició de metàstasis (31,32). Finalment, altres factors que es tenen en compte en el pronòstic són: el subtipus histològic, la invasió limfovascular i la invasió perineural, que determinen un pronòstic pobre, al contrari que la regressió tumoral (19).

Melanoma cutani localment avançat amb afectació ganglionar (estadi III)

A part dels factors descrits anteriorment, en els casos amb afectació ganglionar, les principals variables que determinen el pronòstic són el nombre de nodes limfàtics afectats, presència de micrometàstasis o macrometàstasis en aquests nodes i la localització dels nodes afectats (33).

Melanoma cutani metastàtic (estadi IV)

Els factors de pronòstic principals són la localització de les metàstasis i els nivells sèrics de LDH. Els pacients que tenen les metàstasis distants a la pell, al teixit subcutani o als nodes limfàtics distals, tenen un millor pronòstic comparats amb aquells que tenen metàstasis al pulmó o en qualsevol altra localització visceral distant. Pel que fa als nivells de LDH, els pacients que en tenen uns elevats nivells en sèrum presenten un pitjor pronòstic (33). Breument, la LDH és un enzim metabòlic que catalitza la conversió del piruvat al lactat quan la glicòlisi aeròbica està incrementada. La glicòlisi aeròbica és la via principal responsable de proveir l'energia metabòlica necessària a les cèl·lules tumorals per què aquestes proliferin ràpidament i produeixin metàstasis (34).

1.3.2. Paràmetres demogràfics

Alguns estudis han demostrat que l'edat és un factor de mal pronòstic en els pacients diagnosticats amb melanoma cutani (35). Això és degut al fet que amb l'increment de l'edat del pacient, el gruix del tumor i la ulceració són més elevats (36). Un altre factor que es va relacionar amb una supervivència menor era el sexe masculí (37). Una de les hipòtesis per explicar aquest fet era la localització del tumor primari, ja que es va observar que en els homes apareixien més sovint en el cap i el coll, associats a un pronòstic més dolent (38).

1.3.3. Paràmetres moleculars

Finalment, a causa del desenvolupament dels inhibidors de BRAF, s'ha estudiat el valor de prognosi de tenir el gen *BRAF* mutat i s'ha determinat que la presència d'aquesta mutació està associada a un pronòstic pitjor que els que no la tenen (*wild type*), encara que la teràpia dirigida pugui anul·lar els efectes perjudicials de la mutació (19,39,40). Les mutacions en *BRAF* estan associades a localitzacions anatòmiques sense exposició solar i a pacients més joves (41,42). A més a més, es va associar l'expressió del gen *BRAF* a tumors més gruixuts, ulceració i estadis més avançats segons la classificació AJCC (43).

D'altra banda, els tumors amb mutació en el gen *NRAS* s'han associat a tumors més agressius, lesions més gruixudes, índex mitòtic elevat i alts índexs de metàstasis en nodes limfàtics si els comparem amb els altres subtipus (44,45). En el camp epigenètic, alguns estudis suggereixen el paper de l'estat de metilació d'alguns gens amb el pronòstic de la malaltia. En aquest context, *Vizoso et al.* van demostrar que la hipometilació de *TBC1D16* s'associava amb el procés de metàstasis (46). Així mateix, altres estudis com *Wouters et al.* van descriure perfils amb valor pronòstic, com la metilació del gen *PON3*, o relacionats amb el desenvolupament del melanoma, com la metilació del gen *HOXA9* (47).

1.4. Patogènesi i alteracions moleculars en el melanoma cutani

1.4.1. Carcinogènesi: fases i mutacions *driver*

El procés de carcinogènesi del melanoma cutani és el resultat de l'acumulació d'alteracions genètiques, epigenètiques i alteracions en el microambient del tumor.

Segons el model de Clark, es tracta d'un procés lent però constant que es dona a partir de nevus de melanòcits benignes i que evoluciona finalment a cèl·lules melanocítiques tumorals, a partir de canvis moleculars que donen lloc a canvis de fenotip cel·lular. Les diferents fases d'aquest procés són les següents (**Figura 3**): i) nevus benignes, els quals

es caracteritzen per un increment en la proliferació dels melanòcits; ii) nevus displàstics, els quals tenen característiques morfològiques diferents als nevus normals; iii) fase *in situ* de creixement radial, on la lesió és maligna però el creixement tumoral queda restringit a l'epidermis; iv) fase "infiltrant" de creixement vertical, caracteritzada per una invasió nodular de la dermis i v) fase metastàtica, la qual es distingeix per la infiltració de cèl·lules tumorals al corrent sanguini, envaint altres zones cutànies o altres òrgans (48–50).

Procés de carcinogènesi del melanoma cutani

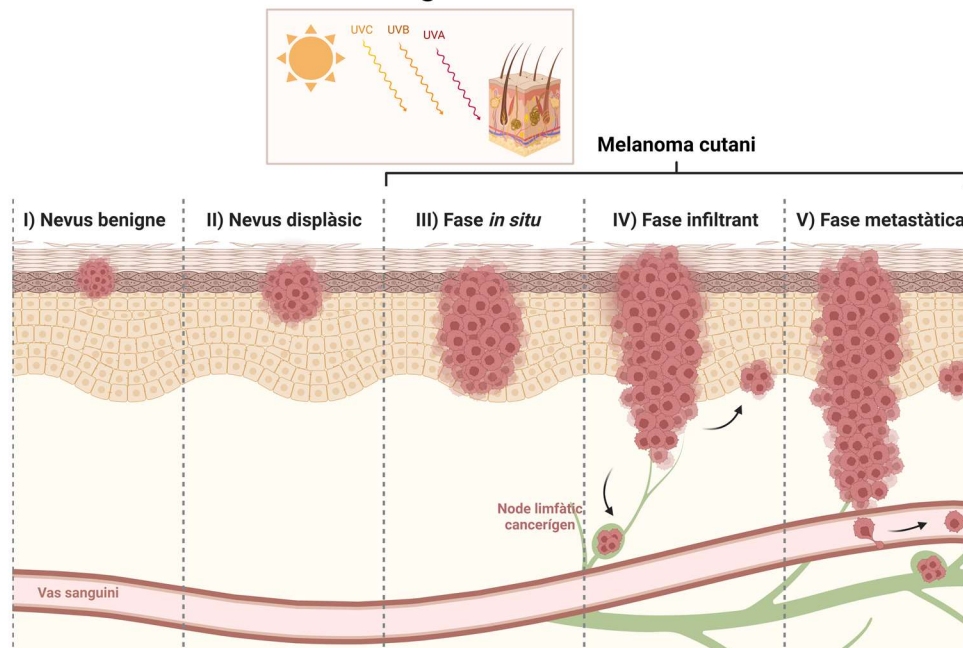


Figura 3. Esquema del procés de carcinogènesi del melanoma cutani, on es mostren les diferents fases de desenvolupament i les mutacions associades. Figura realitzada amb BioRender. Adaptada de (48).

Molecularment, la via de carcinogènesi principal és la presència de mutacions *driver* que causen l'activació constitutiva de la via de les *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) i la via de *phosphoinositol-3-kinase* (PI3K)/*protein kinase B* (AKT) (51).

La via de les MAPK regula la proliferació, el creixement i la migració cel·lular i es troba freqüentment hiperactivada en diferents tipus de càncer. En el melanoma cutani, mutacions en els gens *BRAF*, *NRAS*, *NF1* i *KIT* són les principals responsables de l'activació anormal d'aquesta via (52,53).

El perfil mutacional associat al procés de carcinogènesi pot variar segons l'exposició crònica al dany solar o *cumulative sun damage* (CSD). En aquest context, els melanomes cutanis es poden classificar en dos subtipus segons si el seu origen és causat pel CSD o no (54). En el cas dels melanomes associats a un **baix CSD**,

presenten freqüentment mutacions en el gens *BRAF* (*V600E*), *TERT*, *CDKN2A*, *PTEN* i *P53*. Els tumors associats amb **alt CSD** solen tenir una elevada càrrega mutacional i alberguen mutacions en els gens *NRAS*, *BRAF* (no tipus *V600E*) o *NF1*. A més a més, aquests tumors es localitzen en àrees anatòmiques normalment exposades a la radiació UV, com el cap, el coll o superfícies dorsals de les extremitats distals (54–56).

A més de les alteracions genètiques, les alteracions epigenètiques tenen un paper important en la progressió tumoral, especialment mitjançant la inactivació epigenètica d'alguns gens supressors tumorals. N'és un exemple la metilació de l'ADN de regions promotores de gens com *PTEN* (metilat en ~60% dels melanomes), *SYK* (metilat en el 30% dels melanomes), *TNFSF10D* i *LOX* (metilat en el 80% i el 50% dels melanomes) i *COL1A2* (metilat en 80% dels melanomes) (57).

1.4.2. Classificació genòmica del melanoma cutani

La classificació genòmica del melanoma cutani es va determinar l'any 2015, segons la qual els tumors es podien dividir en 4 subtipus: *BRAF* mutats, *RAS* mutats, *NF1* mutats i triple *wild type* (52).

➤ Mutació en el gen *BRAF*

De les causes genètiques responsables de l'activació anormal de la via de les MAPK, la més freqüent en el melanoma cutani és la mutació somàtica del gen *BRAF* (53). D'aquesta mutació, el subtipus més freqüent és la substitució d'un aminoàcid valina per àcid glutàmic al codó 600 (*V600E*) que condueix a l'activació constitutiva de l'activitat quinasa de la proteïna i, en conseqüència, de la via MAPK. Aquesta mutació és de tipus *missense* i es troba en un 52% dels pacients amb melanoma cutani (52). Tot i que *V600E* és la més comuna en melanoma cutani (representa el 85% de mutacions a *BRAF*), altres variants com *V600K*, *V600D* i *V600R* tenen una representació del 12%, 5% i 1%, respectivament (58,59). Les mutacions de *BRAF* en melanoma s'expliquen amb més detall a l'apartat 3 de la introducció de la tesi.

➤ Mutació en el gen *NRAS*

La segona causa d'activació aberrant de la via de les MAPK és la mutació en el gen *NRAS*, el qual està mutat en el 15-30% de casos de melanoma cutani (41,52). Les mutacions *missense* en els codons 12, 13 i 61 (aquesta última representa el 80% dels casos) promouen l'estat GTP-actiu de la proteïna, provocant l'activació constitutiva de les vies MAPK i PI3K/AKT (53,60,61). S'ha de destacar que les mutacions en els gens *NRAS* i *BRAF* són, en la majoria dels casos, mútuament excloents. Encara que actualment els tumors *NRAS* mutats no tenen una teràpia dirigida eficaç (62),

recentment s'ha descrit la proteïna STK19 com un activador de NRAS susceptible d'ésser bloquejat com a estratègia terapèutica per aquest subtipus de melanoma (63).

➤ **Mutació en el gen *NF1***

La tercera mutació més freqüent és a l'*NF1*, un gen supressor de tumors que es troba mutat en el 10-15% dels melanomes cutanis. La proteïna NF1 és la responsable de la inhibició de RAS. Per tant, la pèrdua de funció de la primera condueix a la hiperactivació de la segona i la subsegüent activació constitutiva de la via de les MAPK i PI3K/AKT (64–66). Actualment, no existeix una teràpia específica dirigida a aquest subtipus de melanoma.

➤ **Triple *wild type***

Els tumors triple *wild type* representen el 25-35% de tots els melanomes cutanis i es caracteritzen per la manca de mutacions en els gens *BRAF*, *NRAS* i *NF1*. Curiosament, aquests tumors presenten una major recurrència de mutacions i amplificacions en els gens *KIT*, *PDGFR* i *VGFR2* (52,67).

➤ **Altres alteracions genètiques**

A més de les alteracions principals descrites anteriorment, n'hi ha d'altres de rellevants en la progressió del melanoma. Les mutacions i amplificacions en el gen *KIT* estan involucrades en l'augment de la proliferació i supervivència de les cèl·lules de melanoma a través de les vies PI3K/AKT i MAPK. Es troben en el 2-8% de tots els melanomes malignes i en una major freqüència en els melanomes acrals o els relacionats a una major exposició solar (68,69). Un altre dels mecanismes característics de la progressió del melanoma cutani és la desregulació del cicle cel·lular, com per exemple a causa de mutacions en el gen *CDKN2A*, que implica una progressió incontrolada del cicle cel·lular ja que impedeix la funció correcta de les proteïnes RB1 i p53 (70). De manera similar, la pèrdua de *PTEN* condueix a l'activació de la proteïna AKT, que regula negativament la via de l'apoptosi de les cèl·lules del melanoma (71). Les alteracions en *PTEN* són mútuament excloents amb les de *NRAS* però coexisteixen freqüentment amb les de *BRAF* (53). Cal destacar també la mutació en el promotor del gen *TERT*, el qual codifica per la subunitat catalítica de la telomerasa. Aquest enzim, en les cèl·lules normals, es troba en un nivell baix i té una relació directa amb l'envelliment i la mort cel·lular. Això no obstant, les cèl·lules de melanoma amb mutacions en *TERT* tenen una activitat elevada de les telomerases, fet que inhibeix l'apoptosi i l'envelliment, per tant, aquestes mutacions es relacionen amb un mal pronòstic de la malaltia (72,73).

1.4.3. Classificació transcriptòmica

Paral·lelament a la classificació genòmica, *Akbani et al.* també van descriure 3 subclasses transcriptòmiques de melanoma cutani: el subtipus “immune”, el subtipus “queratina” i el subtipus “baix MITF”. El subtipus “**immune**” presenta sobreexpressió de gens associats amb cèl·lules immunes (cèl·lules T, cèl·lules B i *Natural Killers* (NK)), molècules de senyalització immune, proteïnes coestimuladores i coinhibidores de punts de control del sistema immunitari i quimiocines. D'altra banda, el subtipus “**queratina**” es caracteritza per una alta expressió de gens associats amb queratines, pigmentació i l'epiteli, així com un pitjor pronòstic comparat amb els altres dos subgrups. Finalment, el subtipus “**baix MITF**” expressa un baix nivell de gens associats amb la pigmentació i l'epiteli, inclosos aquells involucrats en l'adhesió cel·lular, migració i matriu extracel·lular. A més a més, aquest subgrup expressa gens associats amb el sistema nerviós i desenvolupament neuronal (52). La proteïna *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) juga un paper fonamental en el desenvolupament i la plasticitat del melanoma, la importància del qual es descriu tot seguit:

➤ Factor de transcripció MITF

El factor de transcripció MITF regula el desenvolupament, la funció i la supervivència dels melanòcits i com que té una funció en la diferenciació d'aquests, es postula com a un dels promotors de malignitat del melanoma (74,75).

Cal destacar que la proteïna MITF està amplificada en un 20% dels melanomes cutanis i la seva expressió s'ha correlacionat amb un decrement de la supervivència global als 5 anys, comparat amb els que no la sobreexpressen (75). En la **Figura 4** està descrita la via de MITF.

S'ha descrit àmpliament que els melanomes cutanis són molt heterogenis i comprenen diversos tipus de subpoblacions cel·lulars, determinades, en gran part, per l'expressió de MITF. S'han definit dues subpoblacions principals: una població amb elevada replicació però amb baix potencial d'invasió i alta expressió de MITF i una altra que es caracteritza per una proliferació lenta però amb un alt potencial invasiu i baixa expressió de MITF (76). Tot i això, ambdues poblacions poden donar lloc a la formació de tumors i no estan determinades genèticament sinó que sorgeixen per canvis transcripcionals de plasticitat cel·lular que es tradueixen en canvis fenotípics (77).

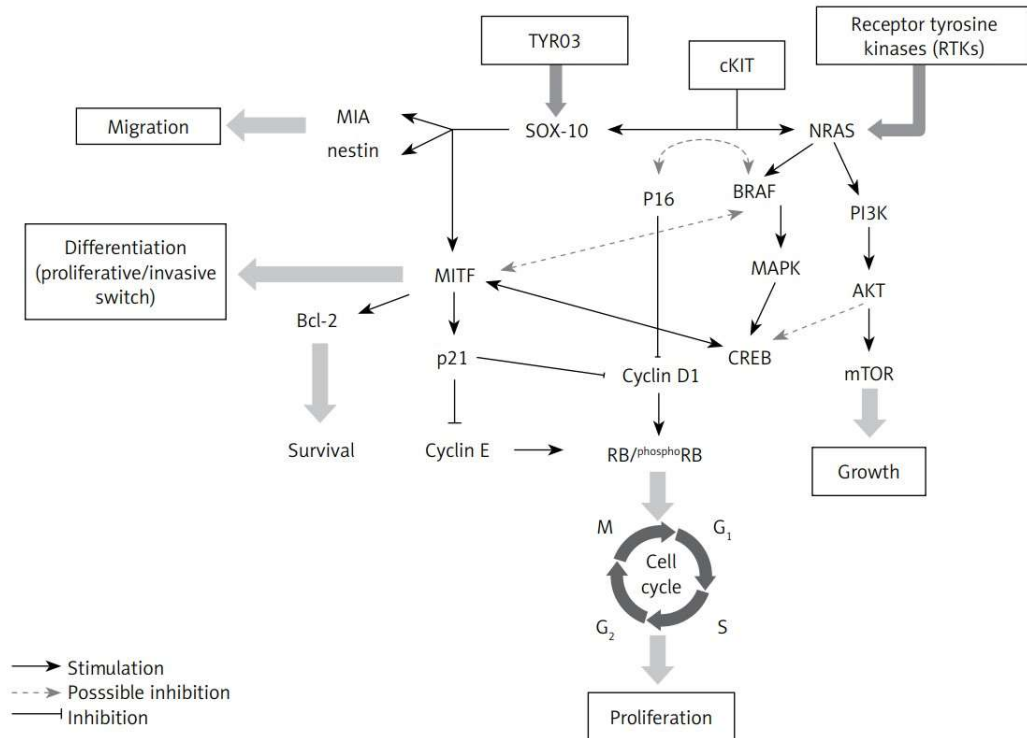


Figura 4. Via de senyalització de l'eix MITF. Figura de (78).

Així doncs, *Goding et al.* van proposar un model anomenat “*rhoestat model*”, per tal d’explicar el paper paradoxal de MITF en el control de la proliferació, supervivència i plasticitat cel·lular. Breument, una alta expressió de MITF promou la diferenciació, un nivell mig, la proliferació, una baixa expressió determina un increment d’un fenotip invasiu i, finalment, l’absència d’expressió de MITF causa senescència i mort cel·lular (79–81) (**Figura 5**).

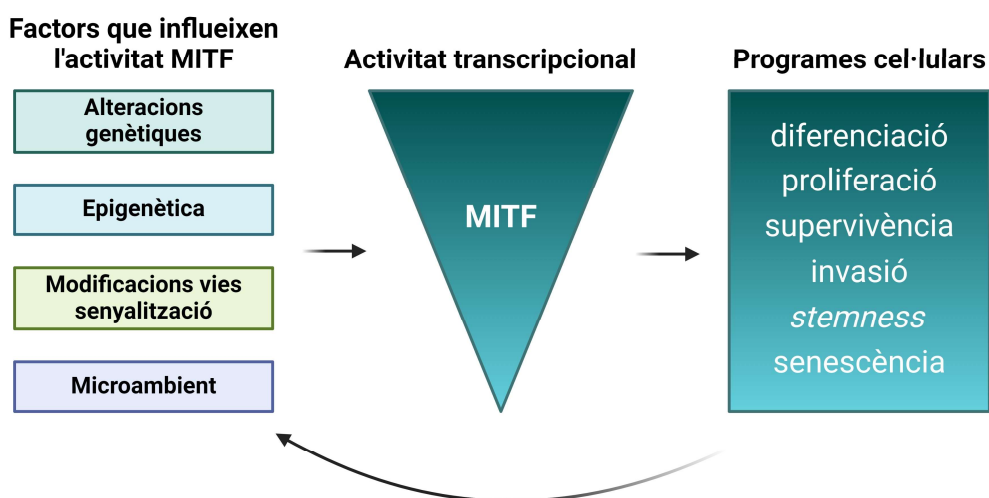


Figura 5. Representació gràfica del “*rhoestat model*” per explicar el paper de l’expressió de MITF en la plasticitat cel·lular en melanoma. Figura realitzada amb BioRender. Adaptat de (82).

1.5. Diagnòstic i estadificació

Els procediments per tal de diagnosticar el melanoma cutani són, en primer lloc, l'examen físic de la pell, on es busquen indicis de lesions cutànies susceptibles a esdevenir un melanoma. En cas que alguna lesió sigui sospitosa, se'n fa una biòpsia per tal de determinar la presència de cèl·lules malignes, a partir de l'estudi histològic i tinció d'immunohistoquímica, basat en la tinció positiva de S100, HMB45, Melan-A, tirosinasa, MITF i SOX10 (83). Una vegada s'ha realitzat el diagnòstic patològic de melanoma, es procedeix a l'estadificació.

L'estadificació del tumor és una eina essencial a la pràctica clínica per determinar el pronòstic dels pacients i el tractament més apropiat. La metodologia utilitzada per a la classificació patològica del melanoma cutani és el sistema TNM (tumor, node, metàstasi) de la *Union for International Cancer Control* (UICC) i la AJCC. Aquest sistema mesura el grau d'infiltració del tumor primari, tenint en compte el gruix i la ulceració (**T**), la propagació als nodes limfàtics adjacents (**N**) i la presència de metàstasis a distància (**M**). Les característiques de cada estadi estan definides a la **Taula 1** (18,84,85).

Malgrat actualment s'utilitza el mètode TNM per a l'estadificació, el gruix de Breslow i, en menor mesura, el nivell de Clark, encara serveixen per guiar el tractament i predir la supervivència (84,86,87).

Addicionalment, en estadis III i IV, es realitza un test molecular per tal de determinar l'estat de la mutació *BRAF*^{V600} i guiar el potencial tractament amb teràpia dirigida. En els casos que no presenten la mutació, anomenats *BRAF wild type* (*BRAF*-wt), es recomana determinar l'estat de les mutacions en *C-KIT* i *NRAS* (88–90).

Taula 1. Criteris d'estadificació del melanoma cutani segons l'AJCC.

Criteris d'estadificació del melanoma cutani segons l'AJCC		
AJCC	TNM	Descripció
0	Tis N0 M0	El tumor està confinat a l'epidermis (Tis). No s'ha propagat als nòduls limfàtics (N0) ni a altres teixits de l'organisme (M0).
I	T1/T2a N0 M0	El tumor no mesura més de 2mm de gruix i pot estar o no ulcerat (T1 o T2a). No s'ha propagat als nòduls limfàtics (N0) ni a altres teixits de l'organisme (M0).
II	T2b/T3/T4 N0 M0	El tumor mesura més d'1mm de gruix (T2b o T3) i pot mesurar més de 4mm (T4). Pot estar o no ulcerat. No s'ha propagat als nòduls limfàtics (N0) ni a altres teixits de l'organisme (M0).
IIIA	T1/T2a N1a/N2a M0	El tumor no mesura més de 2mm de gruix i pot estar o no ulcerat (T1 o T2a). S'ha propagat a 1-3 nodes limfàtics adjacents però només són visibles al microscopi (N1a o N2a). No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).
IIIB	T0 N1b/N1c M0	<p>No hi ha signes de tumor primari (T0).</p> <ul style="list-style-type: none"> S'ha propagat a 1 node limfàtic adjacent (N1b) S'ha propagat a petites àrees de la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor sense arribar als nodes limfàtics (N1c). <p>No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
	T1/T2/T3 N1a o N1b/N1c/N2a o N2b M0	<p>El tumor no mesura més de 4mm de gruix i pot estar o no ulcerat (T1, T2 o T3).</p> <ul style="list-style-type: none"> S'ha propagat a 1 nòdul limfàtic adjacent (N1a o N1b) S'ha propagat a petites àrees de la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor sense arribar als nodes limfàtics (N1c). S'ha propagat a 2 ó 3 nodes limfàtics adjacents (N2a o N2b). <p>No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
IIIC	T0 N2b o N3b/N2c o N3c/N3b o N3c M0	<p>No hi ha signes de tumor primari (T0).</p> <ul style="list-style-type: none"> S'ha propagat a 2 o més nodes limfàtics adjacents, dels quals almenys 1 es pot veure o tocar (N2b o N3b). S'ha propagat a petites àrees de la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor i ha arribat als nodes limfàtics adjacents (N2c o N3c). S'ha propagat als nodes limfàtics adjacents, els quals s'han agrupat entre ells (N3b o N3c). <p>No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
	T1/T2/T3 N2c o N3c/ N2a o N2b M0	<p>El tumor no mesura més de 4mm de gruix i pot estar o no ulcerat (T1, T2 o T3).</p> <ul style="list-style-type: none"> S'ha propagat a petites àrees a la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor i ha arribat als nodes limfàtics (N2c o N3c). S'ha propagat a 4 o més nodes limfàtics adjacents que s'han agrupat entre ells (N2a o N2b). <p>No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
	T3b o T3a ≥N1 M0	<p>El tumor mesura entre 2 i 4mm de gruix i està ulcerat (T3b) o mesura menys de 4mm de gruix però no està ulcerat (T4a). S'ha propagat a 1 o més nòduls limfàtics adjacents i/o s'ha propagat a petites àrees a la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor (N1 o >). No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
IIID	T4b N1a/b o N2a/b/N2c o N1c M0	<p>El tumor mesura menys de 4mm i està ulcerat (T4b).</p> <ul style="list-style-type: none"> S'ha propagat a 1-3 nodes limfàtics adjacents que no s'han agrupat entre ells (N1a/b o N2a/b). S'ha propagat a petites àrees de la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor i pot haver arribat (N2c) o no (N1c) a un node limfàtic adjacent. <p>No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
	T4b N3a o N3b/N3b/N3c M0	<p>El tumor mesura menys de 4mm i està ulcerat (T4b).</p> <ul style="list-style-type: none"> S'ha propagat a 4 o més nodes limfàtics adjacents (N3a o N3b). S'ha propagat als nodes limfàtics adjacents que s'han agrupat entre ells (N3b). S'ha propagat a petites àrees a la pell adjacent (tumors satèl·lit) o als canals limfàtics de la pell que envolta el tumor i ha arribat a almenys 2 nodes limfàtics adjacents o als nodes limfàtics que estan agrupats entre ells (N3c) <p>No s'ha propagat a altres teixits de l'organisme (M0).</p>
IV	T N M1	El tumor pot ser de qualsevol gruix i pot estar o no ulcerat (T). El càncer es pot haver propagat o no als nodes limfàtics adjacents (N). S'ha propagat a nodes limfàtics distants o a altres òrgans com pulmons, fetge o cervell (M1).

2. EL TRACTAMENT DEL MELANOMA CUTANI

Recentment, la supervivència global (SG) i la supervivència lliure de progressió (SLP) dels pacients amb melanoma cutani han millorat radicalment amb l'aparició de tractaments basats en la teràpia dirigida o la immunoteràpia (91). Fins l'any 2011, la SG dels pacients metastàtics era d'aproximadament 9 mesos i aquests es tractaven amb quimioteràpia basada en agents alquilants com dacarbacina (92), fotemustina (93) i temozolamida (94–96), amb una taxa de resposta al voltant del 7%, així com la interleuquina 2 (91,97). En el règim de teràpia adjuvant, el tractament estàndard era l'interferó alfa-2b, amb un baix benefici clínic i unes altes taxes de toxicitat. A la **Figura 6** estan descrites de manera cronològica les diferents teràpies per al tractament del melanoma cutani (98).

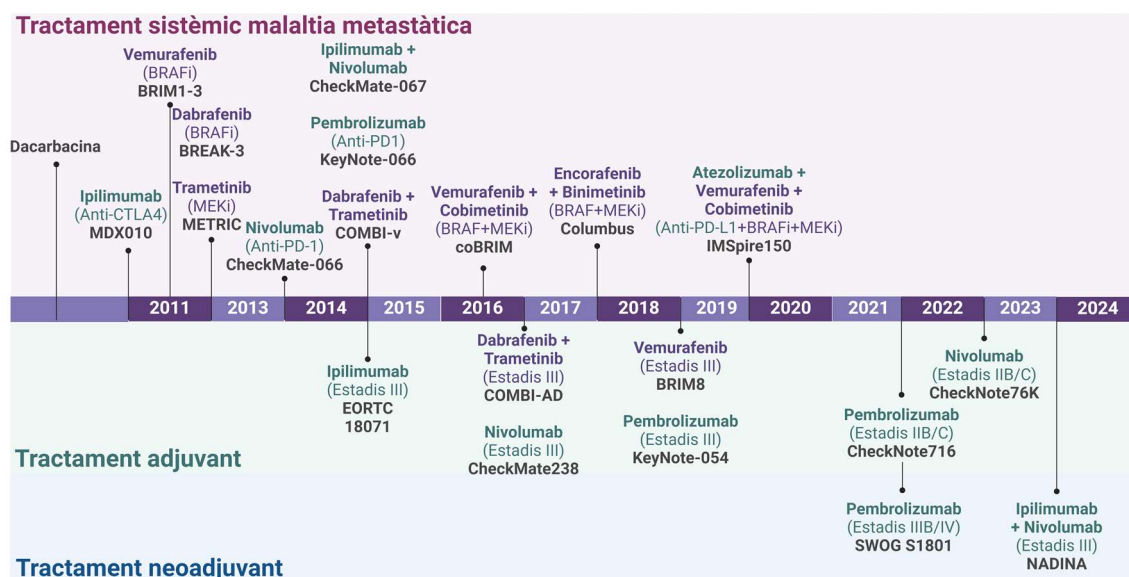


Figura 6. Cronologia de les teràpies aprovades per al tractament del melanoma cutani. A la part superior estan representades les teràpies per al tractament en estadis metastàtics i a la part inferior el tractament adjuvant i neoadjuvant, així com els principals assajos clínics. Figura adaptada de (98). Figura realitzada amb BioRender.

Actualment, les principals teràpies sistèmiques aprovades per al melanoma cutani avançat són la immunoteràpia, basada en inhibidors dels punts de control del sistema immune (ICI), en els estadis III i IV de la malaltia, independentment de l'estat mutacional de *BRAF*, així com la teràpia dirigida, basada en la combinació d'inhibidors de les proteïnes BRAF i MEK, en els casos *BRAF*^{V600} mutats (88,91,99) (**Figura 7**). Una altra teràpia possible és l'aplicació intratumoral de partícules víriques oncolítiques, genèticament dissenyades per expressar inhibidors de punts de control del sistema immune en les cèl·lules de melanoma, forçant la producció i l'alliberament d'antígens

tumorals i del factor estimulant de la colònia de granulòcits (GM-CSF) per impulsar la resposta immunitària de les cèl·lules T i induir la lisi de les cèl·lules tumorals (100).

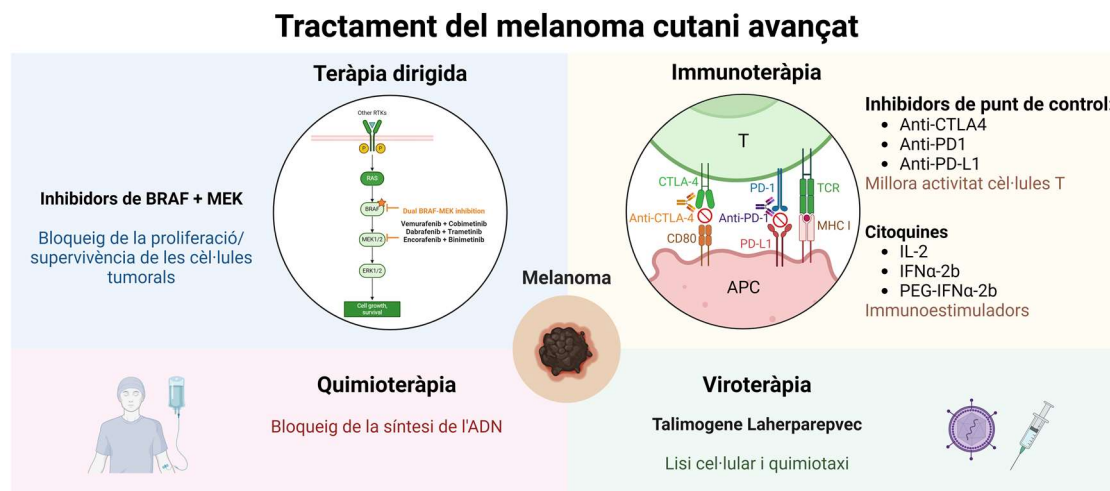


Figura 7. Visió general de les teràpies aplicades actualment per al tractament del melanoma cutani en fase avançada. Abreviatures: T: Limfòcits T; APC: cèl·lula presentadora d'antigen; CTLA-4: proteïna associada a limfòcits T citotòxiques-4; PD-1: proteïna de mort cel·lular programada 1; PD-L1: lligand PD 1. Figura realitzada amb BioRender. Adaptat de (101).

A continuació, s'expliquen amb més detall les dues teràpies sistèmiques principals en el tractament del melanoma avançat, els inhibidors de BRAF+MEK i els ICI.

2.1. Els inhibidors de BRAF i MEK

El millor coneixement de la importància de la mutació en el gen *BRAF* en l'evolució del melanoma cutani, present en un 52% dels pacients, va conduir al desenvolupament de fàrmacs inhibidors específics dirigits contra aquesta mutació (102).

El primer inhibidor específic de BRAF^{V600E} aprovat el 2011 per la *American Food and Drug Agency* (FDA) pel melanoma metastàtic va ser el vemurafenib, gràcies als estudis clínics fases I-III **BRIM 1-3**, que van mostrar una resposta global al fàrmac de més del 50% i una millora en la SLP i la SG en comparació amb la quimioteràpia estàndard (103). Posteriorment, l'inhibidor selectiu de BRAF^{V600E} dabrafenib va ser aprovat gràcies a l'estudi de fase III **BREAK-3**, demostrant a més, activitat contra els casos mutats en BRAF^{V600K} i aquells amb metàstasis cerebrals (104). Tant vemurafenib com dabrafenib, s'uneixen específicament al lloc d'unió de l'ATP del domini quinasa de BRAF i inhibeixen la seva activitat, fet que condueix al bloqueig de la fosforilació de l'*extracellular signal-regulated kinase* (ERK), la inhibició de la proliferació, segrest del cycle cel·lular i inducció de l'apoptosi (**Figura 8**). De manera similar, l'encorafenib és un inhibidor ATP-competitiu del domini quinasa de la família de proteïnes RAF i va ser l'últim inhibidor aprovat, a través de l'assaig de fase III **Columbus**, amb una eficàcia equivalent a vemurafenib en

primera línia de tractament (105,106). Tots aquests inhibidors van millorar la supervivència dels pacients però la resistència a la teràpia apareixia després de 6-7 mesos de tractament en la meitat dels pacients tractats amb inhibidors de BRAF en monoteràpia (107).

A causa que els principals mecanismes de resistència que es produeixen són resultat de la reactivació de la via MAPK (108), es va postular l'estratègia d'utilitzar inhibidors de la proteïna MEK1/2 en combinació amb els inhibidors de BRAF per obtenir un bloqueig de la senyalització de ERK més duradora (109,110) (**Figura 8**). De fet, trametinib, el primer inhibidor selectiu de l'activació de MEK1/2 i la seva activitat quinasa (111) aprovat per la FDA, va demostrar en l'assaig **METRIC**, una baixa eficàcia en monoteràpia (112). En canvi, quan es va combinar amb dabrafenib va mostrar un efecte sinèrgic, amb una millor resposta global i millors taxes de supervivència, en comparació amb ambdós agents separats en monoteràpia (113). No obstant això, els inhibidors de MEK inhibeixen la senyalització d'ERK tant en les cèl·lules tumorals com en les normals, la qual cosa provoca toxicitats *off-target* i en limita la dosi administrable (114,115). Altres inhibidors de MEK aprovats per la FDA són el binimetinib, en combinació amb encorafenib (116) i cobimetinib en combinació amb vemurafenib (117), amb mecanismes similars als descrits anteriorment. En els apartats 2.3 i 2.4, es parlarà amb més detall d'aquestes combinacions entre inhibidors de BRAF+MEK.

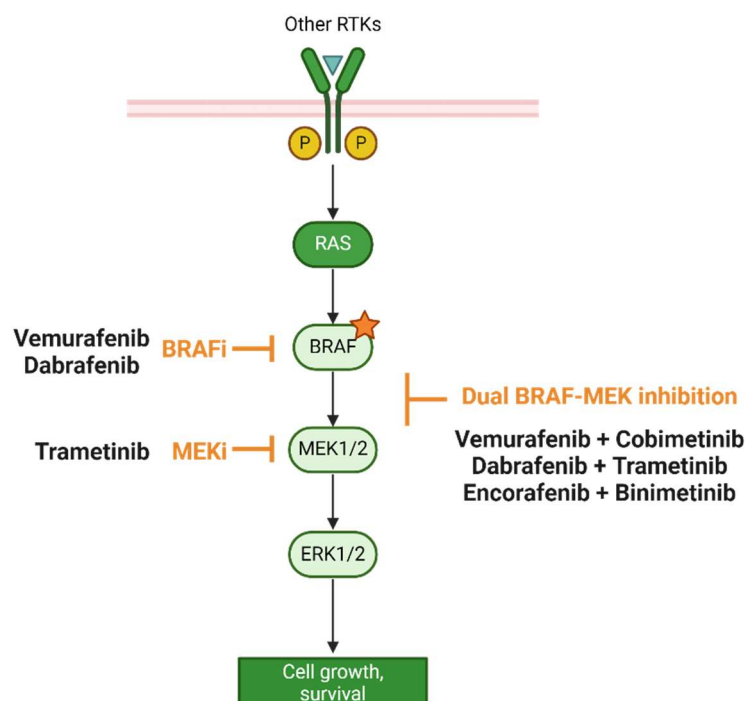


Figura 8. Esquema de la via de les MAPK i punt d'actuació dels inhibidors aprovats en teràpia dirigida per al tractament del melanoma cutani. Figura realitzada amb BioRender.

2.2. Els inhibidors dels punts de control del sistema immune (ICI)

En l'última dècada, la immunoteràpia basada en els ICI ha millorat radicalment la supervivència dels pacients amb melanoma cutani (118). El tractament amb ICI representa una teràpia oncològica innovadora, ja que potencia la resposta immune de l'hoste en el propi tumor, desencadenant l'activació de les pròpies cèl·lules immunes (119).

L'activació i regulació de les cèl·lules T, les quals regulen la resposta immune de l'hoste, és el primer punt de control i es basa principalment en la interacció entre el receptor de les cèl·lules T (TCR) i el pèptid derivat de l'antigen tumoral presentat per l'al·lel del complex major d'histocompatibilitat (MHC), que es troba a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) (118,120). Quan es dona el reconeixement de l'antigen, CD28 amplifica la senyalització de TCR per activar les cèl·lules T i mobilitzar-les cap al tumor. Tot i això, el receptor CTLA4 juga un paper crucial en aquesta regulació ja que actua com un competidor antagonista de la interacció CD28 amb els seus lligands CD80 i CD86 (120,121), inhibint el senyal d'activació de les cèl·lules T (122) (**Figura 9A**).

En aquest context, l'ipilimumab, un anticòs monoclonal anti-CTLA4, va sorgir com a fàrmac antitumoral per bloquejar aquesta senyalització inhibidòria i restaurar l'activació de les cèl·lules T (120). L'ipilimumab va ser aprovat l'any 2011 gràcies a l'estudi **MDX-010**, que va demostrar una millor SLP i SG que la vacuna gp100 en primera línia de tractament del melanoma metastàtic (123). Encara que les respostes es perllongaven en el temps, només es produïen en un 10% dels casos, fet que va fer evident la necessitat de buscar noves estratègies terapèutiques en el camp de la immunoteràpia. Posteriorment, l'arribada dels anticòs en contra del receptor de mort programada 1 (*programmed death 1* (PD-1)) va revolucionar el tractament del melanoma en fases avançades, demostrant superioritat en monoteràpia davant l'ipilimumab en l'estudi **Checkmate-067** (124,125). El rol principal de PD-1 en la membrana de les cèl·lules T actives és inhibir-ne l'activitat en els teixits perifèrics en el moment que es dona una resposta inflamatòria a una infecció, per a limitar l'autoimmunitat (120,126–128). En el context del melanoma, els senyals inflamatoris indueixen l'expressió dels lligands de PD-1 en el teixit tumoral: *Programmed death-ligand 1* (PD-L1) i *Programmed death-ligand 2* (PD-L2), els quals inhibeixen l'activitat antitumoral del sistema immune mediat per cèl·lules T (120) (**Figura 9B**). Per tant, el bloqueig de la interacció entre PD-1 i PD-L1 amb anticòs impedeix la inactivació de les cèl·lules T, que podran continuar atacant les cèl·lules tumorals quan el microambient sigui l'adequat (129).

En aquest context, primer el nivolumab seguit del pembrolizumab, ambdós anticossos anti-PD-1, van ser aprovats en el tractament del melanoma metastàtic i recentment en teràpia adjuvant (130,131). Es parlarà amb més detall del paper d'aquestes teràpies en el tractament del melanoma cutani en els apartats 2.3 i 2.4.

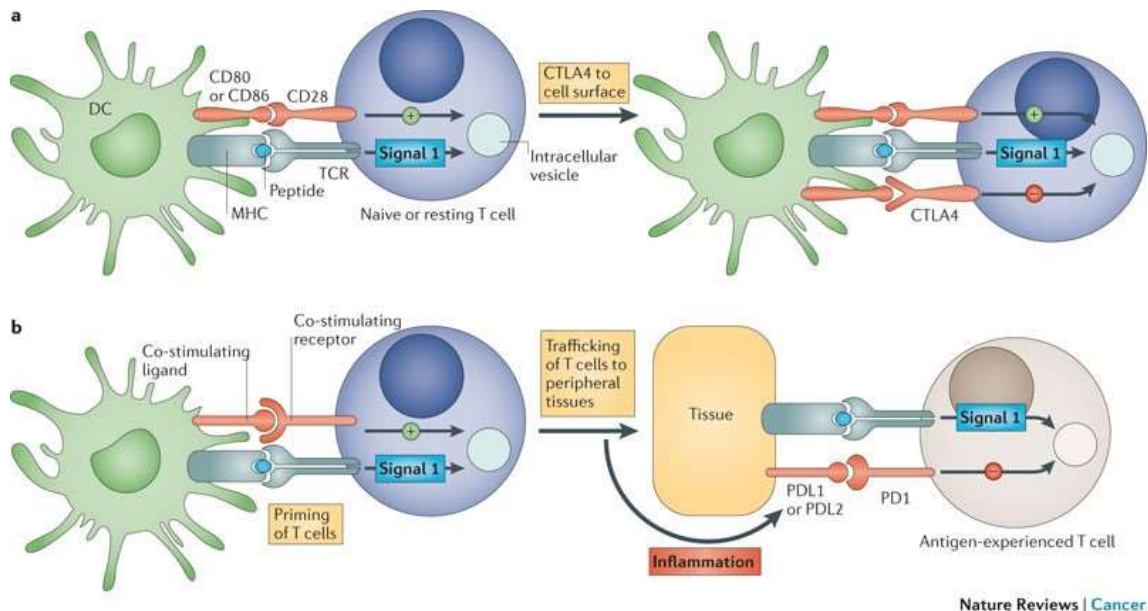


Figura 9. Mecanisme d'acció dels ICI. **A)** Mecanisme d'acció dels CTLA4. La regulació de les cèl·lules T té lloc a partir de la interacció CD28:B7 i per la unió del TCR amb l'antigen MHC classe I. CTLA4 actua com un competidor per inhibir l'activació de les cèl·lules T. **B)** Mecanisme d'acció del sistema PD-1, el qual regula la resposta inflamatòria mitjançant la interacció amb els seus lligands PDL-1 i PDL-2. Figura extreta de (120).

2.3. Tractament de la malaltia localitzada o localment avançada

2.3.1. Resecció quirúrgica

La resecció quirúrgica del tumor és el tractament principal pel melanoma cutani localitzat. A més a més, en aquells pacients que tenen un tumor de gruix superior a 0,8 mm, o de Breslow inferior però que presenten ulceració, es realitza una tinció de contrast. Posteriorment, si els ganglis sentinelles donen positiu per tinció, es realitza una biòpsia i s'analitza patològicament. Si aquests donen positiu per cèl·lules de melanoma, s'acostumava a fer-ne una resecció mitjançant una limfadectomia. Actualment, a causa dels resultats dels assajos **MSLT-II** i **DeCOG-SLT** (132,133), que demostraven que la dissecció completa del node limfàtic no tenia impacte en la supervivència, no es recomana aquest tractament (134).

2.3.2. Tractament neoadjuvant

La teràpia neoadjuvant és l'administració d'un fàrmac abans de la cirurgia. En el context del melanoma cutani, assajos clínics com **OpACIN** (fase I), **OpACIN-neo** (fase II) i **PRADO** (fase II) van avaluar el tractament amb ipilimumab + nivolumab en teràpia neoadjuvant en estadis III (135–137), i van demostrar que s'obtenia una millor resposta quan s'administrava abans de la cirurgia que en tractament adjuvant i que, a més, optimitzava la teràpia posterior. L'any 2022, l'assaig clínic **SWOG S1801** va demostrar que els pacients en estadis de IIIB a IV susceptibles de resecció que havien estat tractats amb pembrolizumab neoadjuvant, i amb teràpia adjuvant post-cirurgia, tenien millor supervivència que aquells que només havien estat tractats amb pembrolizumab adjuvant (138). En el mateix context, actualment hi ha l'estudi **NADINA** (fase III) en marxa, el qual avalua la combinació ipilimumab + nivolumab neoadjuvant vs nivolumab adjuvant (139). Tenint en compte aquests estudis, la immunoteràpia neoadjuvant ha passat a ser una estratègia de tractament per als melanomes cutanis localment avançats.

Respecte a la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK, en l'assaig clínic fase II **NeoCombi** van avaluar el tractament amb dabrafenib + trametinib neoadjuvant en melanomes en estadis III i van observar una elevada proporció de pacients amb respostes completes (140).

2.3.3. Tractament adjuvant

La teràpia adjuvant és aquell tractament que s'administra després de la cirurgia per reduir el risc de recaiguda. A causa de les bones respostes dels inhibidors de BRAF+MEK en el context del melanoma metastàtic *BRAF* mutat, aquests es van estudiar en el marc del tractament adjuvant, inicialment en pacients en estadi III amb afectació regional, que tenen un alt risc de recaiguda després de la resecció (141). En l'assaig clínic **COMBI-AD** es va avaluar l'eficàcia de la combinació de dabrafenib + trametinib en pacients amb melanoma *BRAF*^{V600E/K} mutat en estadi III amb el resultat d'una millora en l'interval lliure de recaiguda (ILR) en 5 anys, que va ser del 65%, en el cas del braç tractat amb la combinació, i del 58% en el braç placebo (142–144). Un altre assaig clínic en aquesta línia va ser el **BRIM8**, que va comparar vemurafenib vs placebo en estadis III de melanoma cutani, però no va ser positiu en l'objectiu primari de ILR ni en SG (145).

Paral·lelament, l'any 2015, la FDA va aprovar l'ipilimumab com a teràpia adjuvant en pacients en estadi III ressecats, basant-se en els resultats de l'assaig clínic de fase III **EORTC 18071**, on es comparava ipilimumab vs placebo (146). Posteriorment, en

l'assaig clínic de fase III **Checkmate238**, es va comparar nivolumab vs ipilimumab i es va observar una eficàcia superior del primer, tant en pacients *BRAF* mutats com *BRAF*-wt, el qual va portar a l'aprovació de nivolumab per la FDA en el context de teràpia adjuvant (147–149). L'assaig clínic que va desencadenar l'aprovació de pembrolizumab adjuvant en estadi III va ser l'estudi de fase III **Keynote 054**, on es va comparar pembrolizumab vs placebo, que va mostrar una millor supervivència lliure de recaiguda (SLR) en la branca de tractament (150,151).

Recentment, l'assaig clínic en fase III **CheckMate 76K** va demostrar que el nivolumab adjuvant en pacients en estadi IIB/C reduïa el risc de recurrència en un 58%, si es comparava amb el placebo (152). En la mateixa línia, l'assaig clínic en fase III **Keynote-716** també va avaluar pembrolizumab adjuvant en pacients en estadis IIB/C i va demostrar la reducció del risc de recurrència en els pacients tractats, comparat amb el placebo (153). Actualment, també hi ha en marxa l'estudi **EORTC-2139/COLUMBUS AD** que compara encorafenib + binimetinib adjuvant vs placebo, en pacients mutats en *BRAF*^{V600E} en estadis IIB/C (154).

Tenint en compte aquests estudis, la teràpia adjuvant ha passat a ser una estratègia de tractament clau per al melanoma cutani, tant en els estadis III com els IIB. Encara que tant la immunoteràpia com la teràpia dirigida han demostrat benefici, a Espanya, l'únic tractament aprovat fins ara, l'any 2024, és el basat en immunoteràpia en els estadis II i III, principalment per l'alt cost de les teràpies basades en inhibidors de BRAF+MEK.

2.4. Tractament de la malaltia metastàtica

En el cas dels melanomes metastàtics, si són susceptibles de resecció i/o donen símptomes, es realitza cirurgia (84,88), de forma paral·lela al tractament sistèmic.

2.4.1. Opcions de tractament en primera línia

El tractament sistèmic de la malaltia metastàtica no susceptible de resecció del melanoma en primera línia inclou la immunoteràpia i, en el cas del melanoma *BRAF* mutat, també la teràpia dirigida. Ambdues teràpies van significar un canvi en el paradigma del tractament del melanoma cutani, millorant dràsticament la resposta global i la supervivència, tant de SLP com de SG.

Tal i com es mostra a la **Figura 6**, l'any 2011 aquests agents es van introduir com a teràpia estàndard en la malaltia metastàtica. Respecte a la immunoteràpia, l'ipilimumab va demostrar superioritat en eficàcia quan es va comparar amb la quimioteràpia clàssica (155,156). No obstant això, a partir de l'any 2014, aquesta opció va ser substituïda pels inhibidors de PD-1, tant nivolumab (131,157) com pembrolizumab (130,158).

Posteriorment, i gràcies a l'estudi **CheckMate-067**, la combinació ipilimumab + nivolumab va demostrar superioritat als agents anti-PD1 en monoteràpia, convertint-se en una de les teràpies estàndard en primera línia del melanoma cutani metastàtic, independentment de l'estat mutacional de *BRAF* (124,159). Els criteris de selecció per aquesta teràpia no són concloents, ja que l'expressió tumoral de PD-L1 no és un bon marcador. Tot i així, alguns estudis han proposat alguns marcadors d'eficàcia com el nivell sèric de LDH i el comptatge de limfòcits, leucòcits o eosinòfils (160).

En el context del melanoma cutani metastàtic amb mutació de *BRAF*, a partir de l'any 2014 i després d'haver estat aprovats en monoteràpia (veure apartat 2.1), la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK va ser aprovada també com a tractament estàndard en primera línia. Els estudis clínics que van demostrar la seva superioritat terapèutica respecte als inhibidors en monoteràpia van ser: a) estudis **COMBI-v** i **COMBI-d**, per a dabrafenib + trametinib (143,144,161), b) estudi **coBRIM** per a vemurafenib + cobimetinib (117,162) i, finalment, c) l'estudi **Columbus** per encorafenib + binimetinib (106,163). Amb aquestes combinacions, es van assolir respostes globals de més del 70%, amb una SLP mitjana del voltant d'un any. Actualment, es recomana tractar amb aquestes combinacions, a excepció que hi hagi alguna contraindicació per als inhibidors de MEK, a causa de la seva toxicitat (88).

Cal destacar que alguns assajos clínics com **IMspire 150** (164,165), **IMspire 170** (166) i **COMBI-I** (167,168) van avaluar l'estratègia de combinar els inhibidors de BRAF+MEK amb els ICI. L'IMspire 170 i COMBI-I no van assolir el seu objectiu primari (165,166) i en el cas de IMspire 150, es va concloure que afegir atezolizumab (anti-PDL1) a la teràpia dirigida era segur i que millorava la supervivència lliure de progressió dels pacients *BRAF* mutats metastàtics (167,168).

Així doncs, els pacients amb melanoma cutani *BRAF* mutat en fase metastàtica, actualment tenen dues opcions possibles de tractament en primera línia, amb una eficàcia equivalent. La decisió de si administrar immunoteràpia o teràpia dirigida és controvertida i en l'actualitat es regeix majoritàriament per criteris clínics, com l'estat ECOG¹ del pacient, els nivells sèrics de LDH o la càrrega tumoral. En general, la immunoteràpia seria una bona estratègia per als pacients amb un bon estat general que poden esperar el seu efecte, que és més tardà però més durador en el temps. Però en aquells casos que els pacients necessiten una resposta ràpida, atès el seu estat ECOG o alta LDH, així com l'alta càrrega tumoral, una millor estratègia podria ser la teràpia

¹ L'estat ECOG del pacient és un criteri estandarditzat per mesurar de quina manera impacta la malaltia en la qualitat de vida del pacient.

dirigida, que provoca respostes més ràpides, encara que generalment menys duradores. De fet, la qüestió de quina pot ser la millor seqüència terapèutica entre ambdues teràpies va ser avaluada en els assajos clínics SECOMBIT i DREAMseq.

L'assaig clínic **SECOMBIT** comparava tres seqüències de tractament: A) encorafenib + binimetinib en primera línia, seguida d'ipilimumab + nivolumab en segona línia, quan s'arribava a la progressió tumoral (PD); B) ipilimumab + nivolumab en primera línia, seguida d'encorafenib + binimetinib en segona línia, quan s'arribava a la PD; i C) braç *sandwitch* on es tractava durant 8 setmanes amb cada combinació: encorafenib + binimetinib seguit de ipilimumab + nivolumab en primera línia fins arribar a la PD. La SG als 4 anys determinava una tendència a una millor supervivència quan s'administrava la seqüència B (169,170) (**Figura 10A**). D'altra banda, l'assaig clínic **DREAMseq** comparava, de forma similar a l'anterior, les seqüències de combinació de dabrafenib + trametinib en primera línia seguida de nivolumab + ipilimumab en segona línia, i viceversa. La SG als dos anys va ser del 71.8% en el braç tractat amb immunoteràpia en primera línia respecte al 51.5% en el braç de la teràpia dirigida (**Figura 10B**). Per tant, es va fer la recomanació de tractar amb immunoteràpia en primera línia, seguida de la teràpia dirigida en segona línia (171). No obstant això, en ambdós estudis es va observar un efecte oposat a l'inici de les corbes de supervivència, de manera que, inicialment, els pacients es beneficiaven més de la teràpia dirigida que de la immunoteràpia. Cal destacar la importància de poder-los identificar, ja que s'ha demostrat que aquells pacients metastàtics que es poden considerar com a llargs supervivents en ambdues teràpies, fins i tot en casos en què la malaltia ha desaparegut, són pacients que han experimentat una resposta completa com a millor resposta en primera línia (172), i que aquest fet reforça la necessitat d'identificar biomarcadors de selecció de la millor opció terapèutica en primera línia, un dels objectius principals d'aquesta tesi doctoral.

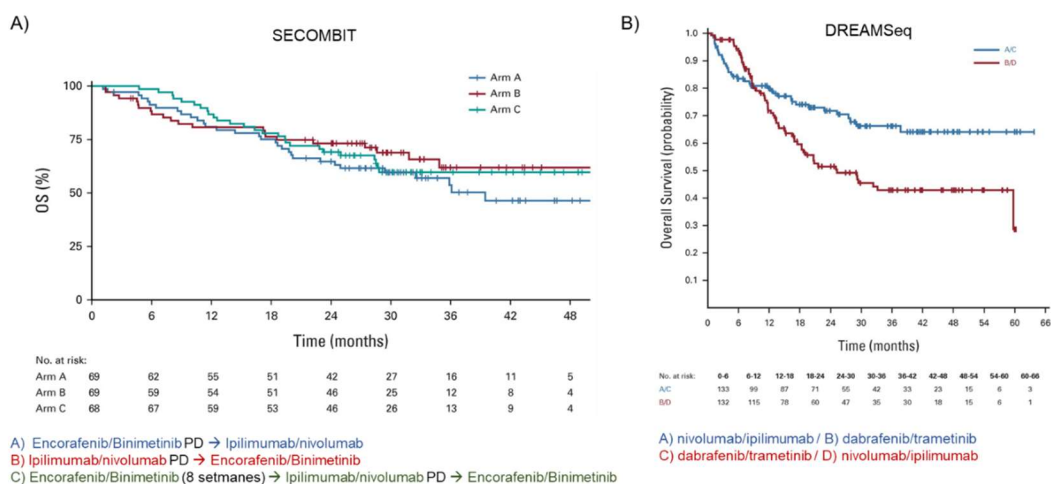


Figura 10. Corbes Kaplan-Meier dels assajos clínics SECOMBIT i DREAMSeq (169,171).

De forma resumida, a la **Taula 2**, estan resumits els assajos clínics més rellevants que van demostrar l'eficàcia dels ICI i dels inhibidors de BRAF+MEK. A la **Figura 11** es representa l'algorisme per a la teràpia sistèmica per al tractament del melanoma cutani segons les guies de la *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* (173).

Taula 2. Assajos clínics rellevants de fase III en melanoma cutani no susceptible a resecció o metastàtic per demostrar l'eficàcia dels ICI i dels inhibidors de BRAF+MEK. Taula adaptada de (129,176).

Assaig clínic	Grups tractament	Estadi	Resultats	Referència
Tractament noadjuvant				
NADINA	Nivo + ipi neoadjuvant vs nivo adjuvant	III	En curs	(139)
Tractament adjuvant				
COMBI-AD	Dabra + trame vs placebo	III	RFS 5y = 52% vs 36%	(142)
CheckMate 238	Nivo vs ipi	IIIB/C i IV ressecats	RFS 5y = 50% vs 39%	(147–149)
Keynote 054	Pembro vs placebo	III	RFS 3.5y = 59,7% vs 41,4%	(150,151)
CheckMate 76K	Nivo vs placebo	IIB/C	RFS 1y = 89% vs 79%	(152)
Keynote 716	Pembro vs placebo	IIB/C	NR	(153)
Tractament sistèmic				
CheckMate 066	Nivo + Placebo vs. Placebo + Dacarbazine	III i IV no susceptible de resecció	OS = 37,5 vs. 11,2	(131,157)
CheckMate 067	Nivo + Ipi → Nivo; Nivo alone, vs. Ipi	Localment avançat no susceptible de resecció/metastàtic		(124,125)
Keynote 006	Pembro 10 q2w vs. Pembro 10 q3w vs. Ipi 3 q3w		OS = 32,7 vs. 15,9	(130,158)
COMBI-v	Dabra + Trame vs. Vem	IIIC i IV no susceptible de resecció	OS = NR vs. 17,2	(159,161)
COMBI-d	Dabra + Trame vs. Dab	IIIC i IV no susceptible de resecció	OS = 25,1 vs. 18,7	(174)
coBRIM	Cobi + Vemu vs. Vemu + Placebo	Localment avançat no susceptible de resecció/metastàtic	OS = 22,3 vs. 17,4	(175)
Columbus	Encora + Bini vs. Encora vs. Vemu	Localment avançat no susceptible de resecció/metastàtic	OS = 33,6 vs. 23,5 vs. 16,9	(105,106)
IMSpire150	Atezo + Vemu + Cobi vs. Placebo + Vemu + Cobi	IIIC i IV no susceptible de resecció	RFS = 15,1 vs 10,6	(164,165)

Abreviacions: nivo: nivolumab; ipi: ipilimumab; pembro: pembrolizumab; dabra: dabrafenib; trame: trametinib; cobimetinib; vemurafenib; encora: encorafenib; bini: binimetinib; atezo: atezolizumab

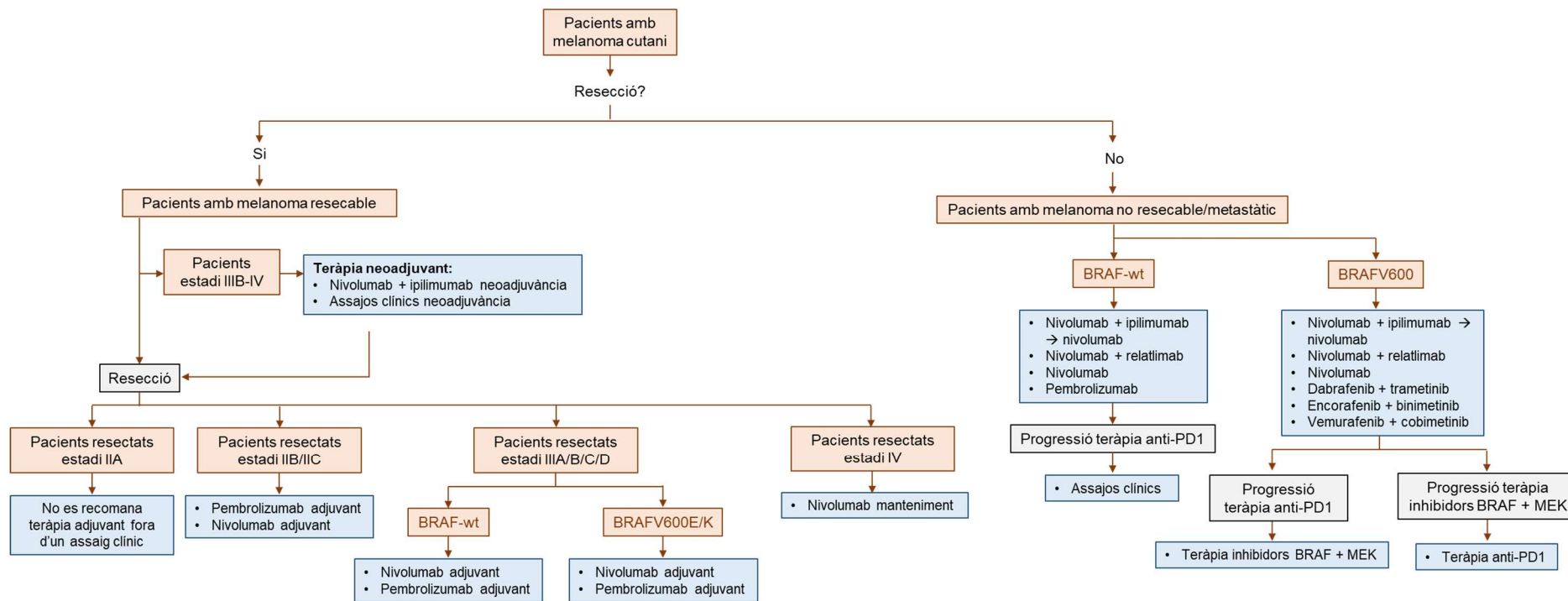


Figura 11. Algorisme de les teràpies aprovades per al tractament del melanoma cutani. Figura adaptada de (173).

3. LA MUTACIÓ DE *BRAF* I LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LES MAPK

3.1. Mutació de *BRAF* i impacte en Pancancer

Una alteració freqüentment present en diferents neoplàsies és la desregulació i l'activació constitutiva de la via de les MAPK, originades per mutacions en algun dels components de la pròpia via, com la mutació en el gen que codifica per la proteïna citosòlica *BRAF* (177). Es tracta d'una mutació en el domini serina/treonina quinasa de la proteïna, que s'ha classificat segons la seva activitat quinasa, dependència de les proteïnes de la família RAS i si s'activa per dimerització (**Taula 3**) (90,178).

Taula 3. Classificació de la mutació de *BRAF* segons la seva activitat quinasa, dependència de la família RAS i activació per dimerització.

Classificació	Activitat quinasa	Dependència de RAS	Dimerització	Mutacions <i>missense</i>
Classe I	Alta	Independent	Monòmer	V600E, V600K, V600D, V600R, etc.
Classe II	Intermèdia/alta	Independent	Dímer	K601E, G469V, G469A, etc.
Classe III	Basal	Dependent	Dímer	G466V, G466A, G466E, D594, G596, N581I, N581S, etc.

La mutació del gen *BRAF* es troba en, aproximadament, un 7% dels diferents tipus de càncer (179) i és especialment comuna en el melanoma cutani, ja que representa el 52% dels casos (180). D'aquests casos mutats, el 80-90% presenten la mutació *BRAF*^{V600E}, el 10% la *BRAF*^{V600K} i el 0,2% la *BRAF*^{V600R} (52). Paral·lelament, també es detecta en un 45% de càncers de tiroides (59), un 10% de càncers colorectals (179) i entre un 2-5% dels càncers de pulmó de cèl·lula no petita (58,181).

3.2. Estructura de la mutació de *BRAF*

La quinasa *BRAF* pertany a la família de les proteïnes RAF (*ARAF*, *BRAF*, *CRAF*) i la seva funció es basa en la transferència de senyals per fosforilació dins de la via de les MAPK, que està involucrada en la proliferació cel·lular, diferenciació i resistència a la mort cel·lular programada (182). El mecanisme pel qual s'activa, té lloc a partir de la interacció amb la proteïna RAS unida a GTP (RAS-GTP), que provoca una disrupció del seu estat d'inactivació, que causa la dimerització de RAF i la seva activació (183).

La família de RAF comparteix tres regions conservades: CR1, CR2 i CR3. Breument, CR1 conté el domini RBD (*RAS binding domain*), responsable de l'activació mitjançant la unió de RAS-GTP. La regió CR2 actua com una articulació flexible entre CR1 i CR2 i està composta per una àrea rica en Ser/Thr que regula negativament l'activitat de RAF.

Finalment, la regió CR3 està constituïda per una regió *P-loop* N-terminal que és crucial per al manteniment de la conformació inactiva de BRAF. A més, també té una regió C-terminal que promou la transferència de l'ATP als substrats de BRAF, on exerceix la seva acció catalítica (183–187) (**Figura 12**).

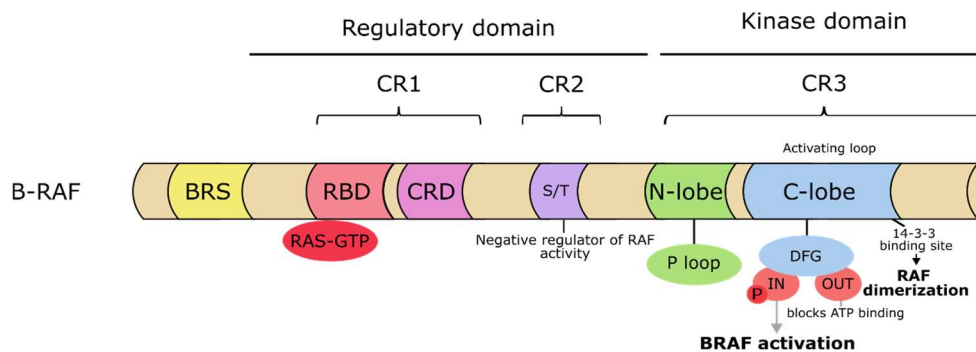


Figura 12. Estructura de la proteïna de BRAF i les regions conservades. BRAF té dos dominis principals: el domini regulador, que inclou CR1 i CR2, i el domini quinasa, que conté CR3. La regió CR3 conté un *loop* activador amb una zona DGF que conté una regió c-terminal que té dues conformacions possibles, la conformació inactiva que bloqueja la zona d'unió de l'ATP i la conformació activa que condueix a la fosforilació del *loop* activador.

3.3. Via de senyalització de les MAPK

El mecanisme de senyalització de la via de les MAPK s'activa a causa d'estímuls externs, com el factor de creixement epidèrmic (EGF), que activen els seus corresponents receptors tirosina quinasa (RTK) i que condueixen a la unió de RAS-GTP al domini RBD de BRAF, el qual porta a la disrupció de l'autoinhibició de la proteïna. Quan BRAF està activa, pot homodimeritzar i heterodimeritzar amb altres membres de la família RAF, fet que promou la fosforilació de la proteïna MEK1/2, seguida de l'activació de la proteïna ERK1/2, que es transporta al nucli i fosforila substrats responsables de la regulació de la proliferació i el creixement (180,182,188).

La via de les MAPK és fonamental per al creixement i la diferenciació de les cèl·lules normals. Aquestes, per evitar una activació persistent d'aquesta via, compten amb mecanismes compensadors que produeixen una retroalimentació negativa per inactivar aquesta via. Són aquests mecanismes els que queden alterats en les cèl·lules amb el gen *BRAF* mutat, fet que condueix a una activació constitutiva de la proteïna i, en conseqüència, d'aquesta via i, finalment, a una proliferació incontrolada (189).

4. MECANISMES DE RESISTÈNCIA A INHIBIDORS DE LA VIA DE LES MAPK

4.1. Mecanismes moleculars implicats en la resistència terapèutica

Generalment, l'aparició de resistència a la teràpia s'ha explicat per una evolució genètica clonal (190), que consisteix a seleccionar els clons cel·lulars amb més possibilitats de supervivència davant la pressió terapèutica, a causa d'alteracions genètiques preexistents (resistència primària o intrínseca) o bé a l'aparició *de novo* al llarg del tractament (resistència secundària o adquirida) (**Figura 13**) (191).

Tot i que la selecció clonal genètica té un rol inqüestionable en el procés de resistència als inhibidors de BRAF+MEK, treballs recents corroboren l'important paper també de la resistència no genètica (192–194), com l'estudi de *Hugo et al.* en mostres de pacients amb melanoma, on va identificar que el 40% de casos de resistència adquirida no es podien explicar mitjançant mecanismes genètics (193). Els mecanismes no genètics inclouen l'expressió d'un programa transcriptòmic concret que ofereix resistència intrínseca al fàrmac o bé la reconfiguració de l'expressió gènica de les cèl·lules per adaptar-se a la pressió de la teràpia, així com mecanismes epigenètics (**Figura 13**) (191,195). De fet, els mecanismes genètics i no genètics no són mútuament excloents i el més probable és que coexisteixin en un grau més o menys elevat en un mateix procés de resistència (191).

Curiosament, es pot establir una analogia entre els models de resistència descrits anteriorment i els mecanismes d'adaptació darwinians i lamarckians:

El **model darwinià** fa referència a la possibilitat que un clon cel·lular resistent relativament estable, que existia abans del tractament, se seleccioni en presència del fàrmac perquè és avantatjós per a la supervivència. Els clons cel·lulars amb aquesta alteració, sigui genètica (**Figura 13A**) o no genètica (**Figura 13C**), es van enriquint al llarg de la pressió terapèutica fins que el tumor resulta resistent de forma estable (195,196). Tanmateix, es podria tractar d'un procés d'adquisició de resistència poc eficient ja que les cèl·lules se seleccionarien però no s'adaptarien a la influència del fàrmac. Per tant, una possibilitat més plausible seria la combinació d'un model de selecció darwinià amb una **inducció lamarckiana** de la resistència, on la plasticitat epigenètica i transcriptòmica té un rol rellevant. En aquest cas, les cèl·lules supervivents a la pressió del fàrmac, *a priori*, no tindrien la capacitat d'iniciar o propagar el tumor. Ara bé, mitjançant la reprogramació adaptativa, aquests clons a diferents nivells: a) podrien adquirir noves alteracions tant genètiques com no genètiques, que els donessin

avantatge per sobreviure (**Figura 13B i D**); b) podrien adquirir característiques fenotípiques pròpies de les cèl·lules mare tumorals (CSCs), fet que permetria la proliferació cel·lular sota la presència del tractament (191). Per tant, una subpoblació inicial seria capaç d'iniciar canvis epigenètics per adaptar-se a la pressió del fàrmac, el que acabaria provocant un canvi de fenotip de les cèl·lules (195).

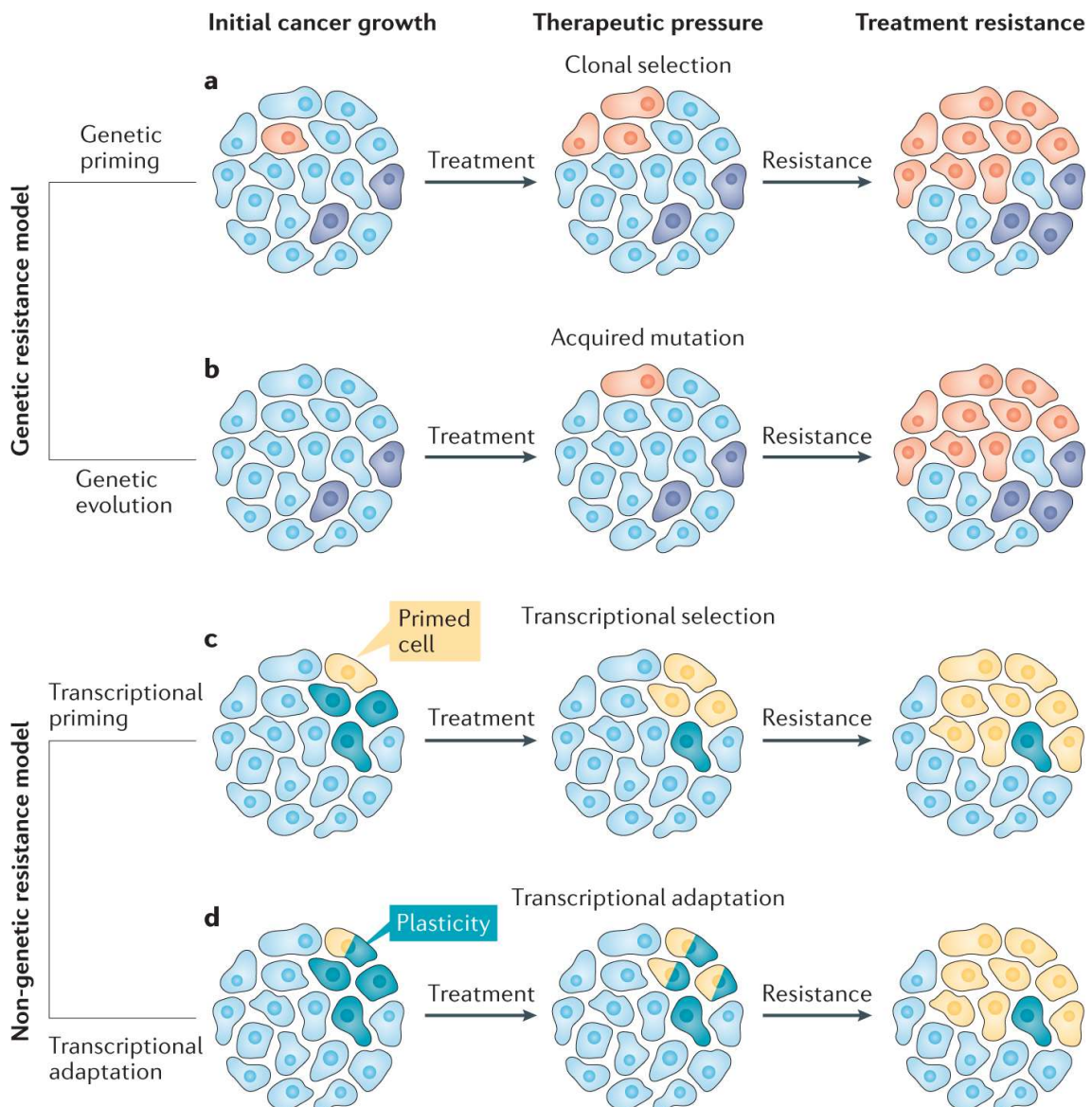


Figura 13. Models de resistència a la teràpia basats en alteracions genètiques vs no genètiques. **A)** Mecanismes genètics de resistència a fàrmacs pels quals una mutació preexistent al tumor és avantatjosa per a la supervivència sota pressió terapèutica conferint la seva selecció clonal i la resistència a una teràpia. **B)** Addicionalment, les cèl·lules tumorals poden adquirir una mutació avantatjosa durant el transcurs del tractament que provoca l'adquisició de resistència. **C)** Mecanismes no genètics que resulten en l'expressió d'un programa transcripcional concret que dona lloc a una resistència intrínseca, fet que provoca la seva selecció clonal sota un fàrmac concret i l'adquisició de resistència. **D)** Les cèl·lules tumorals s'adapten a la pressió del fàrmac mitjançant la reprogramació de l'expressió d'alguns gens que els ofereixen avantatge selectiu en el context de la teràpia i desemboquen en l'adquisició de resistència. Figura de (191).

4.2. Tipus de resistència a la teràpia

La resistència als fàrmacs contra el càncer es classifica en resistència **intrínseca** (primària) o **adquirida** (secundària). La resistència intrínseca es dona quan no hi ha resposta clínica després d'administrar el fàrmac a causa de les característiques del tumor ja presents inicialment, que el tornen refractari a aquella teràpia. En canvi, la resistència adquirida presenta una resposta clínica inicial, però posteriorment hi ha una reaparició o progressió de la malaltia al llarg del tractament.

4.2.1. Resistència intrínseca o primària

Malgrat la millora en les taxes de resposta gràcies a l'aparició de la teràpia dirigida en el tractament del melanoma, el 20% dels pacients amb malaltia *BRAF* mutada no responen d'inici a la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK i presenten una resistència terapèutica intrínseca del tumor (197). Les cèl·lules tumorals que formen el melanoma són molt heterogènies i poden desenvolupar resistència al tractament a causa de diferents mecanismes moleculars ja preexistents, que inclouen mutacions genètiques, canvis epigenètics i alteracions en vies de senyalització (46,57).

A la **Taula 4** estan descrits els principals mecanismes moleculars de resistència intrínseca a inhibidors de BRAF+MEK en melanoma *BRAF* mutat. Breument, la majoria de mecanismes pels quals les cèl·lules tumorals de melanoma esquiven l'efecte de la inhibició de BRAF són deguts a una reactivació de la via de les MAPK.

Paral·lelament, *Amaria et al.* van observar que l'estudi del perfil transcriptòmic de mostres de melanoma basals dels pacients tractats amb dabrafenib + trametinib neoadjuvant i adjuvant, que presentaven resposta completa (RC), presentaven una sobreexpressió de gens associats a les cèl·lules T citotòxiques CD8⁺. A més, els pacients que no experimentaven aquesta resposta presentaven un bloqueig incomplet de la via de les MAPK i nivells més alts d'immunomoduladors negatius expressats per les cèl·lules T CD8⁺, com Tim-3 i Lag-3 (198). De fet, s'ha demostrat l'efecte de la inhibició de BRAF en la modulació immune, on les cèl·lules tumorals de melanoma amb aquesta mutació creen un microambient immunoevasiu, amb una reducció de presentació d'antígens tumorals, així com una sobreexpressió de molècules inhibidores de la funció de les cèl·lules T, com el receptor PD-L1 (199).

Taula 4. Mecanismes de resistència intrínseca a teràpia dirigida en el melanoma *BRAF* mutat.

Alteracions moleculars	Referències	Mecanismes d'acció
Alteracions en cèl·lules tumorals		
10% pèrdua de PTEN	(200–202)	PTEN és un regulador negatiu d'AKT i la seva expressió dona lloc a una sobreactivació de la senyalització de PI3K/AKT i a la proliferació cel·lular, encara que BRAF estigui inhibit.
4% pèrdua de NF1	(66,203)	NF1 és un supressor de senyalització de RAS i la seva pèrdua desencadena la reactivació de la via de les MAPK.
17% ampliació de CCND1 i deleció de CDKN2A	(66,204)	La ciclina D1, que està codificada pel gen CCND1, s'uneix a CDK4 i CDK6 per tal de regular la proliferació. L'activació de la ciclina D1 per la via de les MAPK/PI3K dona lloc a la transició del cycle cel·lular de la fase G1 a la S. Per tant, quan CCND1 està amplificada condueix a la proliferació cel·lular i a una supervivència incontrolada, tot i la presència d'inhibidors de BRAF+MEK.
4-9% mutació a RAC1	(205–207)	RAC1 és una GTPasa que quan s'hiperactiva mitjançant mutacions <i>hotspot</i> (RAC1 ^{PS29}) dona lloc a la proliferació cel·lular i a la migració, tot i la inhibició de la senyalització de BRAF.
5% mutacions a MEK1	(208,209)	MEK1 és un membre de la via de les MAPK que se situa per sota de RAF i que promou la fosforilació de ERK. Quan MEK1 està mutat, la via de les MAPK es manté activa tot i la inhibició de BRAF+MEK.
Pèrdua de USP28	(210)	USP28 és un enzim desubiquitinant que regula els nivells de proteïna de BRAF, MEK i ERK. La pèrdua de USP28 condueix a l'increment dels nivells de BRAF, MEK i ERK, el qual promou el creixement tumoral i la supervivència, tot i la inhibició de BRAF i MEK.
Alteracions en el microambient tumoral		
Activació de HGF /c-MET	(211–213)	La secreció del factor de creixement d'hepatòcits (HGF) per part de les cèl·lules estromals es desencadena en l'activació de c-MET i això resulta en la reactivació de les vies de la MAPK i PI3K-AKT, eludint la inhibició de BRAF.
Expressió d'HIF- 1 α (hipòxia)	(214,215)	El factor induïble d'hipòxia 1 α (HIF-1 α) és un modulador de la transició del fenotip de proliferació cel·lular a l'invasiu en hipòxia. En aquest estat invasiu presenten menys sensibilitat a inhibidors de BRAF+MEK.

4.2.2. Resistència adaptativa o fase de tolerància

Tot i les evidències en els mecanismes de resistència a inhibidors de BRAF+MEK, l'aparició de clons cel·lulars resistents no pot ser únicament explicada per mecanismes genètics (193). El comportament de les cèl·lules neoplàsiques es difícil de predir a causa de l'alta heterogeneïtat i a la plasticitat fenotípica adaptativa que presenten els tumors de melanoma. De fet, l'adquisició de resistència pot establir-se en tres fases o estats diferents: l'estat de persistència, la resistència no estable i la resistència estable (195). L'estat de persistència es caracteritza per la presència d'una petita fracció de clons cel·lulars que són capaços de sobreviure a la teràpia, donant lloc a l'aparició de la malaltia mínima residual (MRD) (191,195,216–219). Aquests clons s'anomenen cèl·lules persistents tolerants a fàrmac (DTPs), que es troben en una baixa freqüència i es caracteritzen per tenir un creixement lent, el metabolisme alterat i mitosi no activa (219–221).

Durant la fase d'adquisició de resistència no estable, es proposa que aquestes DTPs acabin donant lloc a una adaptació i reprogramació transcripcional que els permet, no només ser tolerants al fàrmac sinó proliferar activament en presència d'aquest (192). La plasticitat transcripcional que permet fer aquest canvi de fenotip es produeix mitjançant un procés del desenvolupament anomenat *enhancer switching*. Normalment, aquests mecanismes compensatoris són reversibles i temporals i inclouen plasticitat cel·lular, canvi de fenotip i reprogramació epigenètica i metabòlica (194,195,222–224). Finalment, la resistència estable es dona quan les alteracions tant genètiques com no genètiques adquirides ja no són reversibles i, per tant, quan es retira el fàrmac segueixen tenint un fenotip resistent (191,192,219,225). Aquesta fase es descriu amb més detall a l'apartat 4.2.3.

4.2.2.1. Canvi de fenotip i plasticitat cel·lular

En la fase adaptativa o de tolerància, les DTPs es troben en un estat reprogramable que sota la pressió terapèutica pot produir un canvi de fenotip, conegut com plasticitat cel·lular. Inicialment, en melanoma es van identificar dos programes transcripcionals principals com a estats fenotípics cel·lulars: l'estat diferenciat o proliferatiu, caracteritzat per alts nivells d'expressió de MITF o MITF^{alt} i baixos nivells del receptor tirosina quinasa AXL (*AXL receptor tyrosine kinase*) o AXL^{baix}; i l'estat desdiferenciat o invasiu, amb nivells de MITF^{baix} i AXL^{alt} (226,227). Això no obstant, en els últims anys, s'han reportat nous perfils transcriptòmics quant al melanoma, que descriuen fenotips de plasticitat cel·lular associats a l'adquisició de resistència a la teràpia dirigida (194,228–231), així

com la coexistència de múltiples estats cel·lulars tolerants al fàrmac (232), recollits a la **Taula 5**. Es tracta de 6 estats fenotípics cel·lulars principals:

- **Estat hiperdiferenciat:** caracteritzat per MITF^{alt} i gens regulats per aquest, principalment aquells implicats en la pigmentació cel·lular, i AXL^{baix}. Aquest estat està determinat per una exposició curta a inhibidors de BRAF (49,232,233).
- **Estat melanocític o diferenciat:** expressa MITF^{alt} i SOX10^{alt} (230,231,234).
- **Estat transitori o intermedi:** les cèl·lules de melanoma comencen a canviar de fenotip proliferatiu cap a invasiu. De fet, les cèl·lules, en aquesta fase, comparteixen gens i factors de transcripció relacionats amb els estats diferenciats (MITF^{alt}, AXL^{baix} i SOX10^{alt}) i amb el de cresta neural, com l'alta expressió de *NGFR* (NGFR^{alt}) (49,230). A més a més, aquest estat és moderadament sensible als inhibidors de BRAF (231).
- **Estat SMC** (*starved-like melanoma cells* (SMC)): és conseqüència d'una privació de nutrients a les cèl·lules, que es caracteritza per tenir el metabolisme alterat i un estat de cicle cel·lular lent, que els confereix tolerància a la teràpia dirigida. Aquest estat està definit principalment per l'expressió incrementada de *CD36* (232,233,235).
- **Estat NCSCs** (*Neural Crest Stem Cells* (NCSCs)): es dona quan l'exposició a inhibidors de BRAF+MEK de les cèl·lules tumorals és més prolongada, això condueix a un increment de l'expressió de *NGFR* i a la pèrdua d'expressió de *MLANA*, associada a cèl·lules de melanoma diferenciades (223,236). A més a més, també es caracteritza per l'increment de l'expressió d'*AQP1*, *GFRA2* i *RXRγ* (217,230,232).
- **Estat desdiferenciat:** les cèl·lules són MITF^{baix}, SOX10^{baix}, SOX9^{alt} i AXL^{alt} (230,232). És a dir, han perdut les característiques pròpies de cèl·lules diferenciades de melanoma, com expressió de *MLANA*, tenen un fenotip invasiu i són resistents al tractament amb teràpia dirigida.

Per tant, en una fase inicial de tolerància al tractament, s'activa la via de senyalització MITF, que protegeix les cèl·lules de la mort cel·lular induïda. Així doncs, hi ha un enriquiment de la població MITF^{alt} híperdiferenciada (232,237). Amb una exposició més elevada, aquestes cèl·lules pateixen un canvi metabòlic que dona lloc a l'estat SMC CD36⁺ (235), amb nivells mitjans de *MITF*, que pot donar lloc o a una desdiferenciació o a l'estat NCSCs, el qual es caracteritza per cèl·lules amb un cicle cel·lular lent que persisteixen i s'adapten fins a l'adquisició de resistència de forma estable (193,194,230,236,238) (**Figura 14**).

Taula 5. Llistat de les múltiples classificacions de fenotips de plasticitat cel·lular associades amb adquisició de resistència als inhibidors de BRAF+MEK, basades en perfils transcriptòmics descrits en melanoma. En cada cas, s'indica la publicació, el fenotip cel·lular, el nombre de gens implicats, destacant els més importants, i el tipus de mostra que es va utilitzar per a l'anàlisi.

Signatures (Referència)	Fenotip				Mostres
Hoek et al. 2008 (239)	Proliferatiu		Invasiu		DNA microarray de línies cel·lulars caracteritzades <i>in vitro</i> i injecció s.c en ratolins immunodeprimits
	52 gens (<i>MITF</i> , <i>MLANA</i> , <i>PMEL</i> , <i>TYR</i> , <i>CDH1</i>)		45 gens (<i>AXL</i> , <i>EGFR</i> , <i>ZEB1</i> , <i>WNT5A</i>)		
Verfaillie et al. 2015 (240)	Proliferatiu	Immune	Invasiu		11 cultius cel·lulars de curt termini i RNAseq de biòpsies
	433 gens (<i>SOX10</i>)	1276 gens	458 gens (<i>WNT5A</i>)		
Tirosh et al. 2016 (229)	MITF (no tractament inhibidors BRAF)		AXL (tractament inhibidors BRAF)		Perfils per single-cell RNAseq de cèl·lules malignes i estromals de 19 pacients
	100 gens (<i>MITF</i> , <i>TYR</i> , <i>MEL</i> , <i>MLANA</i> , <i>S100B</i> , <i>CDH1</i>)		100 gens (<i>NGFR</i> , <i>FOSL1</i> , <i>AXL</i>)		
Tsoi et al. 2018 (230)	Melanocític	Transitori	NCSC (cresta neural)	Desdiferenciat	Anàlisi de l'expressió de 53 línies cel·lulars de melanoma
	62 gens (<i>MLANA</i>)	29 gens	66 gens	118 gens (<i>SOX9</i>)	
Rambow et al. 2018 (232)	Hiperdiferenciat	SMC	NCSC (cresta neural)	Invasiu	Models PDX de ratolí que s'han exposat a inhibidors de la via MAPK
	15 gens (<i>PMEL</i> , <i>MLANA</i> , <i>TYR</i>)	14 gens (<i>CD36</i>)	42 gens (<i>SOX10</i> , <i>GFRA3</i> , <i>AQP1</i> , <i>NGFR</i> , <i>GFRA2</i>)	49 gens (<i>FOSL2</i> , <i>AXL</i>)	
Wouters et al. 2020 (231)	Melanocític	Intermedi	Mesenquimal		Single-cell RNAseq de 10 cultius cel·lulars de melanoma i bulk RNAseq de 26 cultius de melanoma
	1574 gens (<i>SOX10</i> , <i>MITF</i> , <i>IRF4</i>)	394 gens	2115 gens (<i>JUN</i> , <i>SOX9</i> , <i>IRF1</i> , <i>FOSL2</i> , <i>ZEB1</i> , <i>WNT5A</i>)		
Baron et al. 2020 (234)	Melanocític		NCSC (cresta neural)	Estrès	Models de melanoma de <i>zebrafish</i> , <i>spatial transcriptomics</i> i mostres humanes
	176 gens (<i>DCT</i> , <i>PMEL</i>)		212 gens (<i>SOX2</i> , <i>SOX10</i>)	61 gens (<i>JUN</i> , <i>FOSB</i>)	
Nomenclatura proposada	Hiperdiferenciat <i>MLANA</i> ^{high} , <i>PMEL</i> ^{high}	Melanocític <i>MITF</i> ^{high} , <i>SOX10</i> ^{high}	Intermedi <i>MITF</i> ^{high} , <i>SOX10</i> ^{high} , <i>NGFR</i> ^{high}	SMC <i>CD36</i> ^{high}	NCSC <i>NGFR</i> ^{high} , <i>AQP1</i> ^{high} , <i>GFRA2</i> ^{high} , Desdiferenciat <i>SOX10</i> ^{low} , <i>SOX9</i> ^{high} , <i>AXL</i> ^{high}

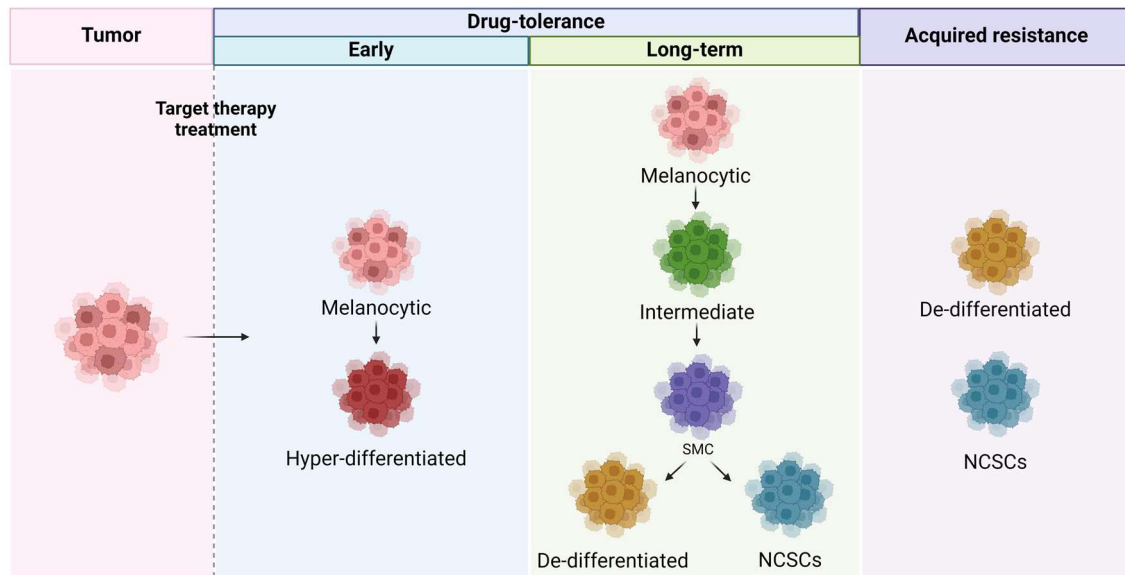


Figura 14. Canvi de fenotip cel·lular al llarg de la fase adaptativa fins a l'adquisició de resistència a teràpia dirigida. Adaptat de (241). Figura realitzada amb BioRender (*Sole-Blanch et al.*; Review submitted).

4.2.3. Resistència adquirida estable

Tenint en compte el que hem exposat anteriorment, en l'adquisició de resistència, la pressió del fàrmac seleccionaria de **manera darwiniana** aquelles cèl·lules que toleren el fàrmac o DTPs, però que no són mitòticament actives. Posteriorment, mitjançant una **inducció lamarckiana**, aquests clons adoptarien una reprogramació transcripcional per donar lloc a noves alteracions o a nous estats fenotípics que els donarien avantatge en supervivència. Finalment, serien seleccionats de nou de **forma darwiniana** per a arribar a un estat de resistència estable sota l'efecte del tractament (191,195). L'adquisició de resistència a inhibidors de BRAF+MEK apareix en un temps mitjà de 12 mesos, amb una progressió de la malaltia. S'ha descrit que la major part de mecanismes associats a l'adquisició de resistència estable són de naturalesa genètica. Aquestes alteracions poden estar presents en una petita proporció de clons que es troben ja inicialment al tumor, que s'han enriquit al llarg del tractament, o aparèixer *de novo* durant la fase de tolerància i ser seleccionades per pressió terapèutica (242). Cal destacar que els mecanismes genètics acostumen a convergir amb mecanismes no genètics, principalment procedents de canvis fenotípics cel·lulars de la fase adaptativa. D'altra banda, aquests últims també poden explicar, per si sols, fins a un 20-40% dels casos associats a l'adquisició de resistència estable (193,217) (**Figura 15A-B**).

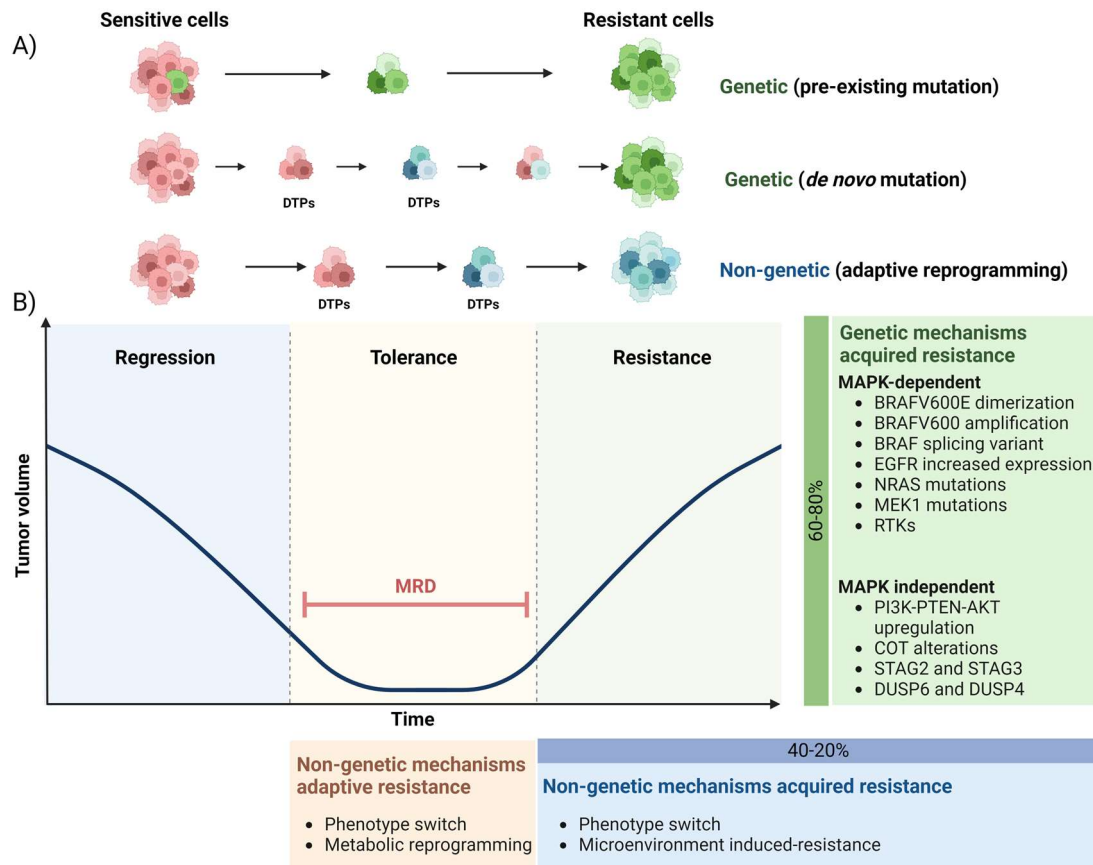


Figura 15. Procés d'adquisició de resistència a la teràpia dirigida en el melanoma. **A)** Esquema dels mecanismes d'adquisició de resistència, tant genètics (selecció de mutacions preexistents d'inici, o aparició de mutacions *de novo* en la fase de tolerància i selecció fins a la resistència estable) com no genètics iniciats principalment en la fase adaptativa. **B)** Esquema de les 3 fases principals d'adquisició de resistència: la regressió del tumor a causa de l'efecte del tractament, la fase de tolerància (o resistència adaptativa) i la fase de resistència adquirida estable. A la figura s'enumeren els principals mecanismes de resistència adaptativa no genètics i els mecanismes de resistència adquirida estable tant genètics, com no genètics. MRD = Minimal Residual Disease; DTP = *drug tolerant persister*. Figura realitzada amb BioRender (Sole-Blanch *et al.*; Review submitted).

A continuació es descriuen els mecanismes moleculars que han estat majoritàriament associats a fenòmens de resistència adquirida estable, tant en el tumor com en el microambient. A causa de l'ampli coneixement dels mecanismes genètics implicats en l'adquisició de resistència a teràpia dirigida, en aquesta tesi ens hem centrat en l'estudi de mecanismes no genètics, focalitzant-nos en canvis transcriptòmics, associats a canvis fenotípics, que podrien estar directa o indirectament associats també a canvis genètics mutacionals o canvis en la metilació de l'ADN.

4.2.3.1. Resistència adquirida en el tumor

Els principals mecanismes d'adquisició de resistència en el tumor són aquells associats a la reactivació de la via de les MAPK, de caire genètic (**Figura 15B**). Breument, aquests

poden dividir-se en dues categories principals: els dependents i els independents de la via de les MAPK.

Els **mecanismes dependents de la via de les MAPK** estan presents en un 70-80% de melanomes amb resistència estable a la teràpia i condueixen a la reactivació de la via de senyalització de MAPK/ERK, malgrat la presència dels inhibidors (242,243). Un d'aquests mecanismes és la presència de **mutacions en el gen NRAS**, que provoca una activació constitutiva de la proteïna i, en conseqüència, de la via. De manera similar, la **dimerització** (244–246) i la presència d'**amplificacions en BRAF^{V600E}** produeixen una sobreactivació de la proteïna, evitant així l'efecte dels seus inhibidors (242,247). El mecanisme de **BRAF splicing variants** s'ha descrit en el 13-30% dels casos i es caracteritzen per tenir manca de RBD. El mecanisme es basa en què la inhibició de la senyalització d'ERK per inhibidors de RAF depèn de nivells de RAS-GTP massa baixos per permetre la dimerització de RAF i això condueix a la resistència (248).

La regulació del receptor de creixement epidèrmic (EGFR) també té un rol important en l'adquisició de resistència a inhibidors de BRAF+MEK. S'ha demostrat que, en general, l'expressió basal d'EGFR en melanoma és baixa (249) però l'**increment de l'expressió d'EGFR**, tant basal com sota pressió terapèutica, provoca resistència als inhibidors de BRAF+MEK, principalment per l'activació de vies alternatives independents de la via de les MAPK, que afavoreixen la supervivència (46,224).

Els **mecanismes de resistència independents de la via de les MAPK** permeten el *bypass* de la inhibició terapèutica per vies alternatives que condueixen a una proliferació continuada de les cèl·lules (l·listats a la **Figura 15**). D'aquests processos destaquem l'**expressió augmentada de l'eix PI3K-PTEN-AKT**, que es van detectar en el 22% dels melanomes que progressaven i del que les principals alteracions són l'activació dels oncogens *PIK3CA* i *AKT3* i la sobreexpressió de mTORC1 (242,250–253). Paral·lelament, altres dels mecanismes descrits són la **sobreexpressió de COT** (254), **sobreexpressió d'altres receptors RTKs** (102,245) o presència de **mutacions en la proteïna MEK1** (247), activant tots ells la proteïna ERK independentment de la senyalització de BRAF.

4.2.3.2. Resistència adquirida mediada pel microambient tumoral

El microambient del tumor juga un paper important en la pèrdua d'eficàcia per l'adquisició de resistència a la teràpia dirigida. En aquest sentit, el seu ús com a diana terapèutica podria ser utilitzat com a estratègia per revertir-la, com seria el cas de la inhibició de les interaccions estroma-tumor.

En aquest context, *Shen et al.* van descriure que la pèrdua de l'antigen estromal 2 (STAG2) o 3 (STAG3) resultava en una major resistència a inhibidors de la via MAPK, mitjançant el decrement dels nivells de la proteïna DUSP6, un regulador negatiu de l'activació d'ERK (255). De manera similar, també s'han reportat altres mecanismes com la regulació negativa de les proteïnes DUSP4 i DUSP6 mitjançant la inhibició de BOP1 (256), així com el rol de l'eix miR-211-DUSP6-ERK5 (257). En un altre treball s'ha descrit que el tractament amb BCI, un inhibidor farmacològic de DUSP1/6, disminueix la supervivència de les cèl·lules resistents a inhibidors de les MAPK i les sensibilitza a inhibidors de BRAF+MEK (258).

Finalment, també s'han descrit mecanismes de resistència associats a les interaccions amb el sistema immunitari. Per exemple, el desenvolupament de la resistència a inhibidors de BRAF+MEK s'ha associat a una reversió del microambient tumoral cap a un estat immunoevasiu, amb un decrement de les cèl·lules T infiltrants i de les cèl·lules NK (259,260) i una restauració de les cèl·lules supressores derivades de la línia mieloide (261). De fet, les cèl·lules T i les cèl·lules NK presents en els tumors resistents a inhibidors de BRAF+MEK estan funcionalment afectades, de manera que són menys efectives en reconèixer i eliminar les cèl·lules tumorals resistents, comparat amb els tumors sensibles (262,263).

Així mateix, aquest ambient immunoevasiu també està potenciat per la inducció de l'expressió de PD-L1 (264–266), un augment de la proteïna immunoreguladora Galectina-1 (267) i l'expressió incrementada de CD47, que és un marcador immunoregulador cel·lular (268).

Un altre mecanisme descrit en la resistència a teràpia dirigida és l'activació de la via de les MAPK en els macròfags durant la inhibició de BRAF, el qual estimula el creixement cel·lular tant de macròfags com de les cèl·lules tumorals de melanoma. A més, els macròfags poden actuar en nínxols inflamatoris, on secreten IL1, activen la via CXCR2 i reverteixen la inhibició de BRAF i MEK (269,270).

5. MECANISMES DE RESISTÈNCIA ALS ICI

Els mecanismes pels quals alguns pacients no responen als ICI o en desenvolupen resistència són variats. Aquests poden ser deguts a factors intrínsecs del pacient, a factors del estroma tumoral o a factors intrínsecs del tumor, com per exemple les característiques genètiques i transcripcionals de les pròpies cèl·lules tumorals que influeixen directament en el reclutament de cèl·lules T al microambient tumoral, fet que

és essencial per a la resposta a aquesta teràpia (271). Els principals mecanismes de resistència a ICI són els següents:

- **Antigenicitat tumoral insuficient:** els neoantigenes tumorals són els activadors de la immunitat antitumoral. De fet, s'ha demostrat una correlació entre la càrrega mutacional del tumor, font de neoantigenes, i la resposta als ICI (272,273). Una de les evidències que proven que els neoantigenes poden ser immunògens claus en el càncer són els resultats d'estudis realitzats en pacients de melanoma que utilitzen vacunes tumorals basades en neoantigenes (274).
- **Senyalització interferó- γ (IFN- γ) intrínseca de tumor:** una resposta efectiva contra un antigen tumoral mediada per les cèl·lules T resulta en l'expressió de l'IFN- γ en el microambient tumoral, que activa la via de JAK-STAT, que indueix l'expressió tumoral de PD-L1, la diana d'actuació dels ICI i, per tant, es produeix la resposta terapèutica. S'ha descrit àmpliament que la disrupció de la resposta de les cèl·lules tumorals a l'IFN- γ és un mecanisme de resistència als ICI (271).
- **Pèrdua del complex principal d'histocompatibilitat (MHC) en el tumor:** és un mecanisme pel qual les cèl·lules tumorals evadeixen l'acció de les cèl·lules T mitjançant la inhibició de l'expressió de MHC en la superfície. Tot i que observar defectes en la via de senyalització de MHC classe I és més freqüent, ja que és la molècula que produeix la presentació d'antigenes davant les cèl·lules dendrítiques, s'ha proposat que defectes en MHC classe II també poden esdevenir biomarcadors de resposta a la teràpia anti-PD1 en el context del melanoma (275,276).
- **Immunoevasió a través de senyalització oncogènica:** algunes de les principals vies de senyalització, pròpies dels processos de carcinogènesi, implicades en la immunoevasió tumoral són la via de WNT- β -catenina, la via de les quinases dependents de ciclina (CDK4 i CDK6), la via de les MAPK i les vies activades després de la pèrdua de PTEN (**Figura 16**). En l'escenari del melanoma amb mutacions en *BRAF*, la sobreactivació de la via MAPK indueix la inhibició de l'expressió de MITF, amb una consegüent pèrdua d'expressió de neoantigenes propis del melanoma, un increment de la producció de citocines immunosupressores i una reducció dels efectes antitumorals de IFN- γ . Tot això desencadena en un microambient immunosupressor. Una estratègia terapèutica per restaurar la sensibilitat als ICI és inhibir la via de les MAPK mitjançant inhibidors de BRAF+MEK, que restaurarien la immunogenicitat del microambient (271) (**Figura 16A-B**).

a Oncogenic signalling pathways

MAPK signalling

- Increased production of immunosuppressive cytokines IL-6 and IL-10
- Negative regulation of antigen presentation
- Suppression of differentiation antigens (melanoma)
- Reduced sensitivity to antiproliferative effects of IFN γ and TNF

WNT- β -catenin signalling

- Increased production of immunosuppressive cytokines
- Disruption of BATF3⁺ dendritic cell recruitment by CCL4
- T_{reg} cell development

CDK4-CDK6 signalling

- Decreased sensitivity to dsRNA via DNMT1
- Decreased antigen presentation
- Decreased interferon target gene activation

Pathways activated after PTEN loss

- Diminished type I interferon response to PAMPs
- Poor T cell recruitment via activation of autophagosome

b

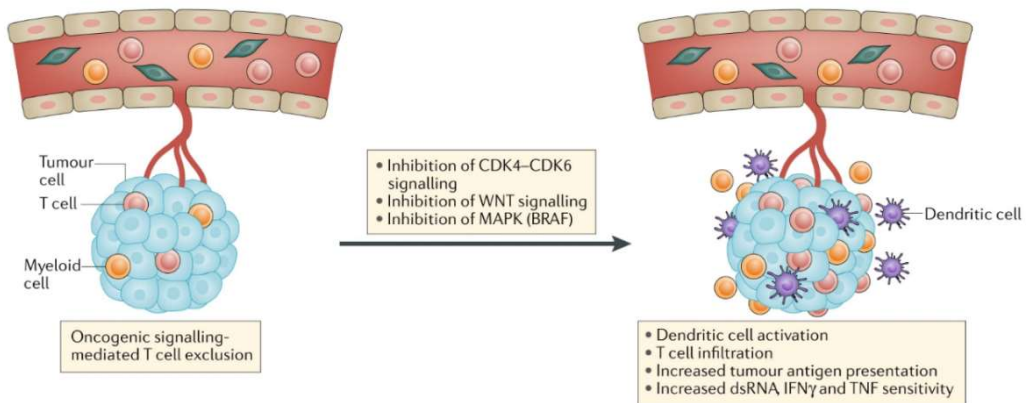


Figura 16. Vies de senyalització oncogèniques que afecten la immunitat antitumoral i la resistència als ICI. **A)** Descripció dels principals mecanismes d'acció de les vies oncogèniques implicades en la resistència als ICI. **B)** La inhibició terapèutica de les vies de CDK4-CDK6, WNT i les MAPK pot revertir l'estat intrínsec de tumor on les cèl·lules T estan excloses i restaurar la sensibilitat als ICI (271).

Hipòtesis

Els pacients amb melanoma cutani avançat que presenten el gen *BRAF* mutat tenen dues opcions terapèutiques vàlides en primera línia: la immunoteràpia, basada en ICI, o la teràpia dirigida, basada en la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK. Encara que existeixen algunes evidències clíniques per a la selecció, no s'han avaluat marcadors moleculars que permetin predir la resposta dels pacients a aquestes teràpies, per discernir quina seria la millor opció terapèutica. Cal destacar la importància d'aconseguir una resposta completa al tractament en primera línia, ja que sembla ser essencial per a obtenir pacients de llarga supervivència.

En primer lloc, a partir d'aquestes premisses, s'ha plantejat la següent hipòtesi per estudiar la selecció de la millor opció terapèutica, que es desenvoluparà a l'Estudi I:

- L'absència de biomarcadors predictius moleculars dificulta la predicció de l'eficàcia d'ambdós tractaments possibles en primera línia en els pacients de melanoma amb el gen *BRAF* mutat. Identificar biomarcadors predictius mitjançant estudis d'expressió gènica en teixit tumoral d'una cohort retrospectiva de melanoma *BRAF* mutat metastàtic, permetrà seleccionar aquells pacients que obtindran benefici clínic amb el tractament de teràpia dirigida enfront a la immunoteràpia, en funció de les característiques del tumor i del microambient.
- Validar l'eficàcia d'aquests biomarcadors en una cohort independent prospectiva permetrà determinar la robustesa dels biomarcadors predictius identificats.

D'altra banda, els pacients amb melanoma cutani *BRAF* mutat amb benefici clínic a la teràpia dirigida acaben desenvolupant resistència adquirida a aquests fàrmacs, i en conseqüència, progressen a la malaltia. S'han descrit àmpliament alteracions moleculars associades directa o indirectament amb la via MAPK, com a mecanismes d'adquisició de resistència principals, però falta evidència sobre biomarcadors associats a la resistència no genètica, com els mecanismes de plasticitat cel·lular, que juguen un paper clau en aquest procés. Per tant, determinar biomarcadors de resistència no genètica per a la teràpia dirigida permetrà dissenyar noves estratègies terapèutiques per evitar i/o revertir aquesta resistència.

Per això, aquest projecte també parteix d'una segona hipòtesi per estudiar el desenvolupament de la resistència secundària al tractament amb inhibidors de BRAF+MEK, que s'analitzarà a l'Estudi II:

- La resistència adquirida a la teràpia dirigida no sempre pot ser explicada degut a alteracions genètiques sinó que alguns mecanismes de resistència es basen en processos transcriptòmics i epigenètics, associats a la plasticitat cel·lular.

Identificar mecanismes transcriptòmics de resistència a partir d'un model de resistència *in vitro* i mitjançant l'anàlisi d'expressió gènica per la tècnica de *single cell RNAseq* (*scRNAseq*) permetrà seleccionar biomarcadors implicats en la plasticitat cel·lular i l'adquisició de resistència no genètica a inhibidors de BRAF+MEK.

- Així mateix, analitzar el paper dels biomarcadors més prometedors en l'adquisició de resistència mitjançant anàlisis funcionals en models preclínic i estudis *in silico*, ens permetrà entendre millor els mecanismes implicats i el seu potencial paper com a nova estratègia terapèutica per revertir aquests processos.

Objectius

OBJECTIUS ESTUDI I

1. Identificació de biomarcadors moleculars per discriminar aquells pacients de melanoma metastàtic *BRAF* mutat que experimentaran benefici clínic i resposta completa a la teràpia dirigida i no a la immunoteràpia, per a poder identificar-los d'inici i convertir-los en potencials pacients de llarga supervivència.

1.1. Determinació de diferències transcriptòmiques en teixit tumoral de mostres parafinades, entre pacients amb melanoma metastàtic *BRAF* mutat que van obtenir benefici clínic a la teràpia dirigida i altres que no, comparant-los amb les diferències obtingudes en pacients tractats amb immunoteràpia en el mateix context, mitjançant la tècnica Nanostring®.

1.2. Integració de dades clíniques i moleculars per a la selecció de gens candidats a ser biomarcadors predictius d'eficàcia d'una estratègia terapèutica enfront de l'altra.

1.3. Validació del poder predictiu dels biomarcadors més prometedors en cohorts prospectives de mostres parafinades de pacients amb melanoma avançat *BRAF* mutat per a ambdues estratègies terapèutiques.

OBJECTIUS ESTUDI II

2. Estudi de la implicació de biomarcadors no genètics en la resistència adquirida als inhibidors de BRAF+MEK.

2.1. Anàlisi mitjançant la tècnica de *scRNAseq* de les alteracions transcriptòmiques, potencialment associades a la plasticitat cel·lular, involucrades en l'adquisició de resistència als inhibidors de BRAF+MEK en un model *in vitro* de resistència adquirida en melanoma *BRAF* mutat.

2.2. Anàlisi integral de dades per a dilucidar els mecanismes adaptatius i de plasticitat cel·lular implicats en l'adquisició de resistència a teràpia dirigida i la selecció dels biomarcadors més robustos per a futurs estudis.

2.3. Estudis funcionals *in vitro* dels biomarcadors de resistència més prometedors per investigar la seva implicació en l'adquisició de resistència i l'efecte de la seva modulació per revertir-la.

Materials i mètodes

1. ESTUDI I

1.1. Inclusió de pacients i generació de la base de dades

Com a cohort retrospectiva de descobriment es van recollir mostres de 45 pacients amb melanoma cutani metastàtic *BRAF*^{V600E} mutat de forma retrospectiva, diagnosticats entre l'any 2005 i el 2018, de l'ICO Badalona i de la col·lecció GEM-1803 del Grupo Español Multidisciplinar de Melanoma (GEM). Es van obtenir blocs de parafina (*formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE)) del moment del diagnòstic o de la recaiguda de la malaltia mitjançant el Biobanc-IGTP, on les mostres van ser codificades.

Pel que fa a la cohort per a la validació dels resultats, es van reclutar prospectivament, a l'ICO Badalona i a l'Hospital del Mar, 32 pacients amb melanoma cutani *BRAF* mutat, des de l'any 2020 fins el 2023. Aquests pacients es trobaven en fase localment avançada, candidats a rebre tractament adjuvant d'immunoteràpia, o en fase metastàtica, candidats a rebre inhibidors de BRAF+MEK o immunoteràpia en primera línia. De cada pacient es va recollir la mostra tumoral inclosa en parafina de forma retrospectiva.

El protocol va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació (CEI) de l'Hospital Germans Trias i Pujol (núm. expedient PI-20-241). Tots els pacients inclosos en l'anàlisi d'expressió gènica van ser informats i van signar el seu consentiment de participar en l'estudi, seguint la Llei 14/2007 d'Investigació Biomèdica, així com la Llei 3/2018 de Protecció de Dades de Caràcter Personal/Reglament Europeu de Protecció de Dades 2016/679. Les mostres biològiques provenien de l'excedent del diagnòstic.

Els criteris d'inclusió i exclusió de l'estudi eren els següents:

Criteris d'inclusió:

- Consentiment informat del pacient.
- Edat igual o major de 18 anys.
- Diagnòstic de melanoma cutani metastàtic *BRAF*^{V600E} mutat confirmat histològicament.
- Pacients que hagin estat tractats en primera línia o en teràpia adjuvant (en el cas de la cohort prospectiva) amb inhibidors de BRAF+MEK o amb immunoteràpia.
- Disponibilitat de teixit tumoral parafinat representatiu amb un mínim d'un 30% de cèl·lules tumorals.

Criteris d'exclusió:

- No complir algun dels criteris d'inclusió.

Quant a la gestió de dades clíniques associades als pacients, aquests van ser pseudoanonimitzats i només els oncòlegs responsables de la inclusió dels pacients tenen la capacitat de revertir-ho. La base de dades clínica es va dissenyar incloent la següent informació:

- Edat i sexe
- Data de diagnòstic
- Data de recaiguda de la teràpia adjuvant (només per a la cohort prospectiva)
- Paràmetres histopatològics: tipus de melanoma i localització del melanoma
- Factors de pronòstic: índex de Breslow al diagnòstic (mm), índex de Clark, ulceració i nivells de LDH basal (U/L)
- Tractament en primera línia: teràpia dirigida o immunoteràpia
- Data d'inici del tractament i data de progressió
- Millor resposta terapèutica
- Estat de progressió (sí o no)
- Estat actual (viu, viu amb malaltia o *exitus*)
- Data de l'últim seguiment o data d'*exitus*

Variables d'efectivitat terapèutica i supervivència definides per analitzar:

- **Benefici clínic:** en les cohorts metastàtiques es van considerar **d'alt benefici clínic** els pacients que van experimentar com a millor resposta, una resposta completa o parcial, que no haguessin progressat abans dels 7 mesos i de **baix benefici clínic**, els pacients amb no resposta (estabilització o progressió) o resposta parcial amb progressió abans dels 7 mesos.
- **Resposta terapèutica:** resposta completa (RC), parcial (RP) o estabilitzacions o progressions com a no resposta (NR). En la cohort de teràpia adjuvant, es va considerar l'estat de recaiguda (sí o no) com a grau de benefici terapèutic (alt o baix, respectivament).
- **Supervivència lliure de recaiguda (SLR):** calculada com la diferència en mesos entre la data de diagnòstic i la data de recaiguda o últim seguiment, si aquesta no s'ha produït.
- **Temps lliure de progressió (TLP):** calculada com la diferència en mesos entre la data de d'inici del tractament i la data de progressió tumoral al tractament o últim seguiment, si aquesta no s'ha produït.
- **Supervivència global (SG):** calculada com la diferència en mesos entre la data de diagnòstic de la malaltia i la data de mort o últim seguiment, si aquesta no s'ha produït.

1.2. Processament de les mostres tumorals FFPE

1.2.1. Desparafinització i digestió dels teixits tumorals inclosos en parafina

Es van obtenir entre 4-6 talls de 10 µm procedents de blocs de teixir tumoral FFPE a través del Biobanc-IGTP, que es van sotmetre a un procés de desparafinització en xilol. Breument, després d'una incubació de 10 min en xilol i una centrifugació a 13.000 rpm durant 1 min, el xilol era descartat i el pellet es resuspensava en 500µl d'etanol al 70% i es tornava a centrifugar a 13.000 rpm durant 1 min. Finalment, es descartava el sobrenedant i s'assecava el pellet per tal d'afegir 240 µl de PKD buffer (provinent del kit RNasy FFPE kit de Qiagen). Es deixaven les mostres en incubació tota la nit a 37°C, en moviment i es van afegir 10ul de proteïnasa k.

1.2.2. Extracció d'ARN procedent de teixits inclosos en parafina

Per a l'extracció d'ARN de mostres FFPE es va utilitzar el kit RNasy FFPE kit (Qiagen) i es va seguir el protocol de la casa comercial. Es va realitzar un pas addicional de tractament amb DNasa per tal d'assegurar que les mostres no estiguessin contaminades amb gADN (ADN genòmic). Per aquest procediment es va utilitzar ezDNase™ Enzyme (ThermoFisher) i es va seguir el protocol de la casa comercial.

La quantificació de l'ARN es va obtenir mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop (Nucliber) que permet determinar la concentració de la mostra (ng/µl) i la qualitat de la mateixa (A_{260}/A_{280}), considerant acceptable la ràtio entre 1,7 i 2. Per tal de poder realitzar l'anàlisi per tecnologia Nanostring® de forma òptima, es va quantificar el percentatge de fragments d'ARN de més de 200 nucleòtids (%DV200) mitjançant el Bioanalyzer 2100 (Agilent). Es va utilitzar la fórmula $(100/DV200)/100$ ng per determinar si les mostres tenien una qualitat i una quantitat adequada, tenint en compte que la concentració mínima indicada per a l'anàlisi és de 100 ng en 5 µl de mostra. La solució final es va emmagatzemar a -80°C fins al seu ús.

1.3. Anàlisi d'expressió gènica per la tècnica de Nanostring

1.3.1 Anàlisi d'expressió usant el nCounter® PanCancer IO 360™ Panel

Per analitzar l'expressió gènica de les mostres seleccionades en la cohort retrospectiva es va utilitzar el panell nCounter® PanCancer IO 360™ de Nanostring®, el qual es caracteritza per incloure 770 gens involucrats en la interacció entre el tumor, el microambient i la resposta immune en el context del càncer. La tecnologia Nanostring® es basa en l'ús d'un codi de barres molecular per a cada gen inclòs en el panell, basats

en ARN marcat amb fluorescència que permet identificar cada gen d'interès a partir d'una seqüència de colors únics, que es llegeix de forma automatitzada (**Figura 17**).



Figura 17. Representació del procés de codi de barres molecular en el què es basa la tecnologia Nanostring®. Figura de <https://nanosttring.com/>.

1.3.2. Anàlisi de dades

Les dades adquirides a partir del nCounter® es van analitzar mitjançant el programari d'anàlisi nSolver™ 4.0.

En primer lloc, es realitzaren uns controls de qualitat interns de la tècnica, que analitzen si l'adquisició de la imatge s'ha realitzat correctament i si l'eficiència de la hibridació és l'adequada, mitjançant l'anàlisi comparativa de concentracions conegudes d'uns controls positius ja incorporats en el panell amb aquest fi. El soroll de fons o *background* es va corregir a partir dels controls negatius, segons els protocols establerts. Finalment, es va dur a terme un control de qualitat de les mostres, per tal d'assegurar que les diferències en l'expressió són degudes únicament a la condició d'estudi i no a la variabilitat tècnica experimental. Mitjançant uns gens constitutius ja incorporats al panell, es van descartar aquelles mostres que no seguien els patrons d'expressió establerts com a acceptables segons el *software*. Els procediments descrits anteriorment es van realitzar seguint els protocols de qualitat establerts pel fabricant (<https://nanosttring.com/products/ncounter-analysis-system/ncounter-analysis-solutions/nsolver-data-analysis-support/>).

Posteriorment, es va realitzar la normalització de les dades mitjançant l'anàlisi d'un control estàndard entre experiments, assumint dades corregides per a ser comparables. Finalment, i per tal de realitzar l'anàlisi comparativa entre grups de mostres, les dades normalitzades es van transformar en format logaritme (\log_2). Per a cada cohort de tractament, es va realitzar una anàlisi d'expressió diferencial entre grups de benefici clínic (alt vs baix) mitjançant el test t-student, assumint variàncies desiguals, considerant significatiu un p-valor inferior a 0,05 ajustat pel test de correcció Benjamini-Yekutieli. Es va calcular també el valor *fold change* entre grups per a cada gen i es va representar per a cada cohort de tractament a través d'una representació *volcano plot*. Els valors d'expressió quantitativs per a cada un dels grups a comparar, es van representar en

forma de diagrames de caixa o *Box plot* per a cada gen i estratificats per cada cohort de tractament, mitjançant el programa Graphpad Prism.

1.3.3. Selecció dels gens candidats

La selecció dels gens candidats es va realitzar a partir dels següents criteris de selecció:

- a) Gens amb una expressió diferencial entre pacients que tenien alt benefici clínic respecte els que el tenien baix, estratificats per cohort de tractament, amb un p-valor ajustat $<0,05$ i un $\log_2(\text{fold change}) >1,5$ o $<-1,5$ considerant que la dimensió del canvi era prou gran per tenir impacte biològic.
- b) Aquells que complissin els criteris de a) en ambdues cohorts, com a potencials factors pronòstic.
- c) Aquells que complissin els criteris de a) en la cohort tractada amb teràpia dirigida, i que es comportessin de forma oposada en la d'immunoteràpia, com a potencials factors predictius d'eficàcia per a la selecció de la millor teràpia.

1.3.4. Correlació estadística dels gens candidats amb les variables clíniques

Les correlacions estadístiques entre els gens candidats i les variables clíniques es van realitzar mitjançant el programari SPSS Statistics 26. Per a l'anàlisi descriptiva de la cohort clínica de descobriment retrospectiva, les variables qualitatives es van representar en percentatges i les variables quantitatives a través de la mediana i el rang. Les variables qualitatives van ser correlacionades pel test de Txi-quadrat o Fisher i es va considerar que les diferències eren estadísticament significatives quan el p-valor $<0,05$. El TLP i la SG es van avaluar a partir de les corbes de supervivència Kaplan-Meier i es van analitzar mitjançant la funció log-rank. Per tal de determinar si les variables clíniques i histopatològiques tenien un impacte en el TLP i la SG, es va realitzar una anàlisi univariada de regressió de Cox, representat per la *hazard ratio* (HR) amb un interval de confiança del 95% (95%CI). Es va realitzar una anàlisi multivariada de regressió de Cox amb aquelles variables que tenien un impacte en la variable de supervivència estudiada, considerant com a factors independents aquelles amb un p-valor $<0,05$.

Finalment, es van calcular les corbes ROC per a establir el valor predictiu dels diferents potencials biomarcadors. Es va calcular l'àrea sota la corba (*Area Under the Curve* (AUC)) i es va considerar estadísticament significatiu el p-valor $<0,05$. Addicionalment, es va calcular el valor predictiu positiu (VPP), que indica la probabilitat que una pacient tingui la condició de l'objecte d'estudi quan el resultat de la prova és positiu, i el valor

predictiu negatiu (VPN), que indica la probabilitat que una pacient no tingui la condició d'estudi quan el resultat de la prova és negatiu. Les representacions gràfiques i les anàlisis estadístiques de les corbes de supervivència i les corbes ROC es van realitzar amb el programa GraphPad Prism.

1.4. Validació de l'expressió dels gens candidats en la cohort retrospectiva i estudi en la cohort de validació per la tècnica de RT-qPCR

Per tal d'estudiar l'expressió gènica dels diferents gens d'interès, seleccionats a partir de l'anàlisi per Nanostring® en la cohort de descobriment, en el teixit tumoral FFPE procedent de la cohort de validació, es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa a temps real (RT- qPCR) després d'un procés de retrotranscripció de l'ARN.

1.4.1. Retrotranscripció

Es va realitzar la retrotranscripció (RT) d'ARN a ADN còpia (ADNc) utilitzant la retrotranscriptasa M-MLV (Thermo Fisher). Inicialment es va partir d'entre 500ng-1000ng d'ARN en un volum màxim de 10µl. A la mostra se li va afegir 1 µl de *primers* tipus Random Hexamer (50ng/µl) (Thermo Fisher) i 1µl de mix de dNTPs 10mM i es va incubar 5 minuts a 65°C. A continuació, es va posar la mostra en gel i es va afegir 4µl de buffer 5X (Thermo Fisher), 1µl de 0,1M dithiothreitol DTT (Thermo Fisher), 1µl de H₂O, 1µl de RNAsa OUT (Thermo Fisher) i 1µl de M-MLV (Thermo Fisher). Es va seguir el següent programa de RT: 2 min d'incubació a 37°C, *annealing* 10 minuts a 25°C, extensió 5 minuts a 37°C i inactivació de l'enzim 15 minuts a 70°C. L'ADNc resultant es va emmagatzemar a -20°C.

1.4.2. Anàlisi d'expressió de candidats per RT-qPCR

Per analitzar els gens candidats per RT-qPCR es van utilitzar sondes Taqman®, mitjançant la tecnologia *PrimeTime Gene Expression* de IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/gene-expression/primetime-custom-probe-based-assays>).

La RT-qPCR es va realitzar en plaques de 384 pous i es van afegir 2,5µl de ADNc procedent de la mostra i 7,5µl de la corresponent *master mix* a cada pou. La *master mix* utilitzada va ser PrimeTime® Gene Expression Master Mix (IDT) juntament amb els *primers* i la sonda "PrimeTime GE assay" (IDT) (500nM de stock pels *primers* i 250nM de stock per la sonda) (0,5µl/rxn). El gen de la β-ACTINA es va utilitzar com a control endogen, així com un *pull* d'ARN procedent de línies cel·lulars i teixit tumoral de melanoma, com a control exogen, per a normalitzar els resultats interexperimentals.

Es van dissenyar els següents *primers* i sonda per a analitzar l'expressió dels gens candidats mitjançant l'eina *PrimerQuest™* (IDT), tenint en compte que l'amplicó resultant tingués menys de 90 pb, ja que el material procedent de teixit parafinat acostuma a estar molt fragmentat (**Taula 6**):

Taula 6. *Primers* i sondes utilitzats per a l'anàlisi d'expressió gènica mitjançant RT-qPCR.

	Forward Primer (5'-3')	Sonda (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
GHR	TATCCTTAGCAGAGC	AGTCTGCAAAGTGTTA	CTTGGTGAATTTAGGC
	ACCCT	ATCCAGGCCT	TCCTTAGA
CCL21	CATCCCAGCTATCCT	AAGCGCTCTCAGGCA	CTCCTTTGGGTCTGCA
	GTTCTTG	GAGCT	CAT
CXCL8	CGCCAACACAGAAAT	TCTGATGGAAGAGAGC	CCCTCTGCACCCAGTT
	TATTGTAAAG	TCTGTCTGGA	T
β-ACTINA	TGAGCGCGGCTACA	ACCACCACGGCCGAG	TCCTTAATGTCACGCA
	GCTT	CGG	CGATTT

La RT-qPCR es va realitzar amb l'aparell *Real-Time PCR Applied Biosystems 7900HT* (Thermofisher), mitjançant el següent protocol (**Taula 7**):

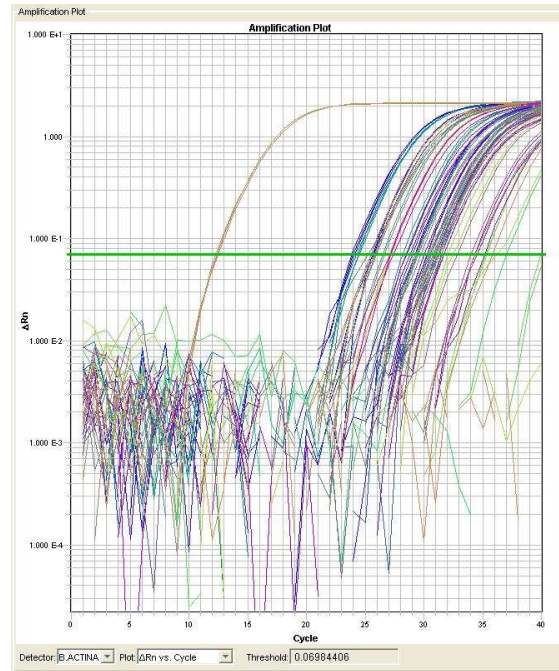
Taula 7. Programa dels cicles de PCR utilitzats pels experiments de RT-qPCR amb Taqman®.

	Cicles	Temperatura	Temps
Pre-incubació	1	95°C	10 minuts
Amplificació	40	95°C	15 segons
		60°C	1 minut
Refrigeració	1	4°C	∞

Tots els *primers* i sondes dissenyats es van testar i validar prèviament mitjançant el càlcul d'una recta patró a partir de l'anàlisi d'un banc de dilucions ½ d'una mostra control. Es van considerar validats aquells assajos que mantenien (i) una proporcionalitat exponencial de cicles d'expressió (Ct) per cada dilució ½ (per cada dilució ½ augmentava 1 Ct), amb una $R^2 \geq 0,98$ i (ii) una linealitat constant entre els Cts d'expressió del gen endogen i els del gen problema (ΔCt) en cada dilució amb una pendent de la recta inferior a 0,2.

Breument, els Cts d'expressió per cada mostra i gen, s'enregistren en forma de corbes a temps real. Al finalitzar l'anàlisi i per comparar els nivells d'expressió dels gens entre mostres, utilitzant els valors Ct, s'estableix un valor llindar per gen que es trobi en la part exponencial de la corba en totes les mostres (**Figura 18**).

Figura 18. Exemple d'un gràfic d'amplificació d'un gen analitzat. Les corbes representen l'amplificació del gen en cada mostra analitzada. El valor llindar es mostra en la gràfica en color verd i talla la corba en la part exponencial. Aquest valor és depenent de cada gen i normalment es troba entre 0,1 i 0,2.



Al nivell marcat pel valor llindar, el corresponent Ct per a cada gen problema es relativitza al Ct del control endogen, expressat com la diferència de Ct (ΔCt) a partir de la següent fórmula:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen control}}$$

Adicionalment, per tal de poder normalitzar els resultats entre diferents experiments, l'expressió dels gens per a cada mostra es relativitza al control extern mitjançant la següent fórmula:

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{mostra problema}} - \Delta Ct_{\text{mostra ref}}$$

Finalment, es calcula el valor $2^{-\Delta \Delta Ct}$ que mostra com d'expressat està cada gen en cada mostra comparat amb l'expressió en la mostra control.

Per tal d'assegurar que la mostra no està contaminada amb gADN o que aquest es troba en un percentatge molt baix per a cada mostra es fa l'anàlisi d'expressió del gen endogen usant ARN sense retrotranscriure o *RT minus* i es calcula el percentatge de contaminació a través de la següent fórmula, considerant un valor superior al 5% com a contaminat:

$$2^{\Delta Ct_{RT\ MINUS}} = 2^{Ct_{RT\ MINUS\ gen\ control} - Ct_{gen\ control}}$$

$$\% \text{ ADN genòmic} = 100 / 2^{\Delta Ct_{RT\ MINUS}}$$

Per a cada mostra i per a cada gen es van introduir 3 replicats i els resultats es van considerar vàlids si la desviació estàndard entre ells era inferior a 0,25.

1.4.3. Anàlisi estadística per a la validació de marcadors a la cohort de validació

Per a cada gen candidat, es va fer una prèvia validació en la cohort retrospectiva on els valors d'expressió obtinguts a través de l'anàlisi per RT-qPCR van ser correlacionats amb els derivats de l'anàlisi d'expressió per tecnologia Nanostring®, mitjançant el test de Spearman, considerant que existia correlació quan el p-valor era inferior a 0,05 i que, per tant, ambdues tècniques eren equivalents.

Les correlacions estadístiques entre els gens candidats i les variables clíniques es van realitzar mitjançant el programari SPSS Statistics 26. Per a l'anàlisi descriptiva de la cohort clínica de validació, es va utilitzar la metodologia descrita en l'apartat de mètodes 1.3.4.

S'utilitzà el test estadístic t-student per determinar les diferències entre les condicions experimentals d'eficàcia terapèutica. En la present cohort, i a causa que la majoria de casos inclosos van rebre el tractament en règim adjuvant, es va considerar com a eficàcia terapèutica haver sofert o no recaiguda/progressió de la malaltia. En l'anàlisi de supervivència, es van analitzar les variables TLP i/o SLR. La correlació dels resultats amb les variables clíniques, per a realitzar l'anàlisi de supervivència, es realitzà mitjançant les mateixes funcions descrites en l'apartat 1.3.4. Es va considerar com a significació estadística un p-valor inferior a 0,05.

2. ESTUDI II

2.1. Generació de línies cel·lulars amb resistència adquirida a la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK

Per tal de generar el model *in vitro* de resistència adquirida a inhibidors BRAF+MEK es va usar la línia cel·lular de melanoma cutani IGR37, amb la mutació *BRAF*^{V600E}, obtinguda al *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms* (Braunschweig, Germany). Es tracta d'una línia cel·lular procedent de la metàstasi ganglionar d'un home de 26 anys amb melanoma, de la qual també hi ha disponible la línia cel·lular IGR39, establerta a partir del tumor primari cutani del mateix pacient.

Aquestes cèl·lules van ser cultivades en medi complet, que consisteix en medi DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementat amb 10% de FBS (REACTIVA), 1% de Penicilina-Streptomicina (ThermoFisher), 2mmols de L-glutamina (Life Technologies) i 10mM d'HEPES (Life Technologies). Els cultius cel·lulars es van mantenir a 37°C i en una atmosfera de 5% de CO₂. Tant en les fases basals com en les diferents fases d'adquisició de resistència, les cèl·lules van ser caracteritzades per *AmpFLSTR*TM

Identifiler[™] (Thermofisher)” per assegurar la seva autenticitat i es van sotmetre a tests periòdics de contaminació per Micoplasma.

Per a generar línies resistents a la combinació de dabrafenib (GSK2118436, Selleckchem) i trametinib (GSK1120212, Selleckchem), les cèl·lules IGR37 es van exposar a concentracions creixents d'ambdós fàrmacs, començant amb una concentració de 5nM de dabrafenib i de 0.5nM de trametinib, mantenint la ràtio de les dosis consultada a la bibliografia (277). L'exposició era continua fins a arribar a la confluència cel·lular, moment en que eren tripsinitzades amb tripsina 1x, una part eren criopreservades amb *Recovery Cell Culture Freezing Medium* (Thermo Fisher) i la resta eren sembrades de nou i exposades a la dosi duplicada per ambdós fàrmacs. Es va repetir el procés i, després de 8 mesos de tractament, es van establir les línies derivades resistents per triplicats independents (IGR37-R1, IGR37-R2 i IGR37-R3), amb una dosi final de 320nM de dabrafenib i 32nM de trametinib. A partir d'aquest punt, les cèl·lules resistents es van mantenir en medi complet suplementat amb aquestes dosis de fàrmac.

2.2. Assajos de viabilitat cel·lular

Els assajos de viabilitat cel·lular es van realitzar mitjançant l'assaig de citotoxicitat cel·lular MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) per tal de testar l'efecte dels fàrmacs dabrafenib i trametinib en el creixement cel·lular, i establir les dosis inhibidores per a la monitorització de l'adquisició de resistència.

Breument, se sembraren 1000 cèl·lules per pou en plaques de 96 pous (Nunc, Labclinics). Les cèl·lules es van tractar durant 6 dies amb un rang de dilucions des de 0,01nM a 10000nM de dabrafenib i 0,001nM a 1000nM de trametinib. Per a cada punt de tractament es van incloure 8 rèpliques experimentals, així com en la condició control, sense tractament. A les 72 hores, el medi de les cèl·lules es canviava i s'afegien fàrmacs nous a les mateixes concentracions. El sisè dia de tractament, el medi es reemplaçava per solució de MTT, que consisteix en 10% de MTT (Sigma-Aldrich), 10% de FBS i 80% de medi RPMI no suplementat (Gibco, Invitrogen). Després d'una incubació de 4 hores a 37°C i 5% de CO₂, les cèl·lules es van suplementar amb 100µl d'una solució de 0.1% SDS en HCl 0,01M. Finalment es va mesurar la densitat òptica (OD) a 570nm després d'una incubació tota la nit a 37°C i en una atmosfera de 5% de CO₂.

La viabilitat cel·lular es va calcular a partir de la mitja de les rèpliques i es va normalitzar a la condició control, la qual es va considerar com el 100% de viabilitat. La supervivència a cada dosi de tractament es va determinar a través del mètode de la *median effect line*. Aquest mètode consisteix en la representació gràfica del $\log_{10}((1/fn)-1)$, on f_n són les diferents fraccions de la viabilitat obtinguda pel \log_{10} de la dosi de fàrmac. El programari

GraphPad Prism es va utilitzar per generar les corbes resposta dependents de dosi i calcular les IC_{50} , on es representen les mitjanes i la desviació estàndard de 3 rèpliques independents. Les anàlisis estadístiques es van realitzar a partir d'un t-test no aparellat, considerant un p-valor $<0,05$ com a estadísticament significatiu.

2.3. Anàlisi d'expressió gènica per cèl·lula individual o *scRNAseq*

2.3.1. Preparació de les línies cel·lulars i anàlisi d'expressió gènica

Per la preparació per a l'anàlisi de les línies IGR37 i la seva derivada resistent a inhibidors de BRAF+MEK, IGR37-R1, es va partir de la sembra d'almenys 10^5 cèl·lules perquè finalment es trobessin a una confluència del 80%. Les cèl·lules es van centrifugar i resuspendre en PBS+BSA 0,05% per a ser posteriorment processades al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmic (CNAG), al grup de *Single Cell Genomics* (CNAG). Breument, es va preparar la llibreria per ARNm 3' (*10x Genomics single cell*) (<https://www.10xgenomics.com/single-cell-technology>) i posteriorment aquest es va seqüenciar mitjançant la tecnologia NovaSeq 6000 S1, v1.5 (Illumina). Per a fer les anàlisis, es van capturar 5000 cèl·lules per mostra i es van realitzar 4×10^4 lectures per cèl·lula.

2.3.2. Anàlisi bioinformàtica i estadística de dades

Les dades d'expressió gènica derivades de l'anàlisi anterior, van ser analitzades en col·laboració amb el Grup de Genòmica Funcional del CNAG. Les anàlisis d'expressió diferencial per cèl·lula individual o *single cell* entre la línia cel·lular resistent i sensible es van realitzar mitjançant el test Wilcoxon Rank Sum i el p-valor ajustat es va calcular aplicant la correcció de Bonferroni per a comparacions múltiples utilitzant l'entorn Seurat dins de R. Vam considerar els gens com a diferencialment expressats si el p-valor ajustat era menor que 0,01, el seu $\log_2/FC/$ era major que 0,25 i s'expressava en més d'un 10% en alguna de les dues condicions.

Es va fer una anàlisi de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) per estudiar l'enriquiment de les diferents signatures associades amb diferents fenotips cel·lulars, tant en els clons cel·lulars sensibles com els resistents, descrites anteriorment (Taula 5; apartat Introducció). Es van realitzar mitjançant la funció *fgsea* en l'entorn R i utilitzant el \log_2 FoldChange com a mètrica estadística per ordenar els gens: es va establir el valor *normalized enrichment score* (NES) i el p-valor ajustat, calculat pel mètode de Benjamini-Hochberg per a comparacions múltiples. Els llistats de gens que componen cada signatura es van extreure de (278). Per altra banda, el *scoring* d'expressió entre les diferents signatures i els gens d'interès significativament alterats en cada condició

(IGR37-S i -R1) es va representar mitjançant la projecció UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*). Aquest *scoring* es va generar utilitzant la funció *AddModuleScore()*, que compara l'expressió de la llista de gens d'interès amb l'expressió de la resta de gens de la cèl·lula. També es va fer un estudi de l'expressió correlacionada entre gens individuals amb la funció *FeatureScatter()* i es va corregir amb el mètode *màgic*. Així mateix, es va correlacionar l'expressió entre el gen candidat i les signatures mitjançant una projecció UMAP.

Per tal d'identificar gens candidats implicats en el procés d'adquisició de resistència, es van seleccionar aquells gens amb un diferencial d'expressió entre grups o $\log_2(\text{fold change})$ superior a 1,5 o inferior a -1,5, i un p-valor ajustat inferior a 0,01, a partir del prèviament mencionat test *Wilcoxon Rank Sum*. Addicionalment, es va aplicar un criteri de filtratge basat en que la diferència entre la proporció de clons cel·lulars que expressaven aquell gen (pct) en una condició experimental vs l'altra fos d'almenys el doble ($\text{pctR}/\text{pctS} \geq 2$ o $\text{pctS}/\text{pctR} \geq 2$). Llavors, es va realitzar una anàlisi d'Ontologia Gènica (GO) per tal d'identificar en quins processos estaven involucrats els gens candidats, mitjançant l'eina *DAVID functional annotation Chart* (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>). Aquesta eina permet identificar els processos biològics (BP), els components cel·lulars (CC) i la funció molecular (MF) principalment associats als gens d'interès.

2.3.3. Criteris de selecció de biomarcadors de resistència adquirida com a potencials dianes terapèutiques

A partir dels resultats de l'anàlisi d'expressió diferencial entre les cèl·lules resistents i sensibles es van seleccionar aquells gens amb expressió augmentada en les cèl·lules resistents, que complissin els següents requisits, addicionals als esmentats a l'apartat anterior:

- 1) que el percentatge de cèl·lules que expressessin el gen candidat a la condició resistent (pctR) fos superior al 80% i en els clons de la condició sensible (pctS) inferior al 10%.
- 2) criteris d'interès basats en la bibliografia: que s'hagués descrit la implicació del gen en processos implicats en la progressió tumoral en altres neoplàsies o en la resistència terapèutica en relació amb la via MAPK.

2.4. Estudis funcionals *in vitro* per modulació del gen candidat

2.4.1. Extracció i quantificació d'ARN en línies cel·lulars

L'extracció d'ARN es va realitzar a partir de pellets procedent de les línies cel·lulars amb el kit *E.Z.N.A Total RNA kit I* (Omega) i es va seguir el protocol de la casa comercial (<https://omegabiotek.com/product/total-cellular-rna-e-z-n-a-total-rna-kit-i/?cn-reloaded=1>). La quantificació de l'ARN es va obtenir mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop (Nucliber), el qual permet determinar la concentració de la mostra (ng/μl) i la qualitat de la mateixa (A_{260}/A_{280}). La solució final es va emmagatzemar a -80°C fins al seu ús.

2.4.2. Extracció i quantificació de proteïna de les línies cel·lulars

Per obtenir l'extracte de proteïna total es va partir de pellets cel·lulars, que es van resuspendre en 80-100 μl de buffer RIPA (NP-40 1%; Na deoxycolate 0.5%; SDS 0,1%; EDTA 1mM; NaF 50mM; NaVO₃ 5mM). Després de ser incubades 15 minuts en gel (4°C), es van centrifugar a 13.000 rpm durant 15 minuts. La quantificació de proteïna es va realitzar en el sobrenedant utilitzant el kit *DC Protein Assay* (BIORAD), amb el mètode *Lowry*, seguint el protocol de la casa comercial (<https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>).

2.4.3. Anàlisi de l'expressió gènica per la tècnica de RT-qPCR

Per a l'anàlisi de l'expressió del gen candidat, l'ARN procedent de les línies cel·lulars es va analitzar per la tècnica RT-qPCR mitjançant la tecnologia SYBR[®] Green. Després d'un procés de retrotranscripció a partir de l'ARN total, tal i com es descriu en l'apartat 1.4.1. (secció Metodologia), l'amplificació per RT-qPCR es va realitzar en plaques de 384 pous, afegint 2,5μl d'ADNc de cada mostra i 7,5μl de la corresponent *master mix*. Es van fer 3 replicats experimentals per mostra i per gen a analitzar. La *master mix* utilitzada va ser SYBR[®] Green (CONDA) juntament amb els *primers* corresponents al gen candidat (IDT) (5μM de stock) (1μl/rxn), l'ADNc de cada mostra i H₂O de PCR (fins a un volum total de 10μl). Per portar a terme l'anàlisi, es va utilitzar el termociclador *Roche Lightcycler[®] 480 II* (Roche Life Science).

Es van dissenyar els següents *primers* per al gen candidat, mitjançant l'eina *PrimerQuest[™]* (IDT), usant com a control endogen el gen de la β-ACTINA:

- *Primer forward* β-ACTINA: 5' TGAGCGCGGCTACAGCTT 3'
- *Primer reverse* β-ACTINA: 5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'

- *Primer forward* SPOCK1: 5' CCAAAGCACAAAGGCAGAAAG 3'
- *Primer reverse* SPOCK1: 5' TGGAGAGCTCCAAACCAATC 3'

Tots els *primers* es van testar i validar mitjançant l'anàlisi de la corba de dissociació (*melting curve*). Les anàlisis de la quantificació de l'expressió dels gens es van realitzar seguint el mateix mètode que l'apartat 1.4.2 de la metodologia.

2.4.4. Anàlisi de l'expressió de proteïna per la tècnica de Western Blot

Els homogenats de proteïnes es van descongelar i es van afegir 50 µg de proteïna en 4x NuPAGE LDS (Novex, Life Technologies) i agent reductor (Novex, Life Technologies). Aleshores, les mostres es van incubar a 70°C durant 10 minuts per a la seva desnaturalització. Per tal de separar les bandes proteiques, es va realitzar una electroforesi en un sistema *Xcell4 SureLock Midi-Cell* (Life Technologies) i amb un tampó MOPS/SDS (50 nM MOPS, 50 nM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH = 7,7), usant gels de poliacrilamida prefabricats *NUPAGE Novex Bis-Tris Gel 10%* (Novex, Life technologies). Es va utilitzar un marcador de pes molecular (Noves® Sharp Pre-Stained Protein Standard, Life technologies) i es van fer migrar les mostres a 200 V durant 1 hora. Posteriorment, les bandes proteiques es van transferir a una membrana de PVDF de 0,45 µm (fluorur de polivinilidè, Inmobilon-FL, Millipore), que es va activar prèviament amb metanol, durant 1 hora a 100V i 4°C, utilitzant tampó de transferència (27 nM Tris, 197 mM Glicina i 20% metanol).

Després de ser activades novament amb metanol i d'un rentat amb TBS, les membranes es van bloquejar durant 1 hora a temperatura ambient amb tampó de bloqueig (50% TBS i 50% Blocking Buffer of Odyssey® (LI-COR). A continuació, l'anticòs primari (**Taula 8**) es va incubar tota la nit a 4°C en agitació i durant 50 minuts en fosc amb l'anticòs secundari (**Taula 8**). Finalment, després dels últims rentats, les imatges es van adquirir utilitzant la tecnologia Odyssey (LI-COR). La quantificació de les proteïnes a partir del senyal fluorimètric de la seva corresponent banda, es va realitzar amb el programari ImageStudio™ i els valors resultants es van normalitzar usant una proteïna d'expressió constitutiva com a control endogen (β-ACTINA). Els gràfics resultants i les anàlisis estadístiques comparatives entre condicions es van realitzar amb el programari Graphpad Prism, utilitzant el test t-student de dades no aparellades procedents de 3 experiments independents.

Taula 8. Llista d'anticossos primaris i secundaris utilitzats pels experiments de Western Blot.

Anticossos	Dilució	Casa comercial
Anticossos primaris		
Anti-SPOCK1 Rabbit polyclonal (ab229935)	1:1000	abcam
Anti- β actina Mouse monoclonal (A2066)	1:20000	Sigma-aldrich
Anticossos secundaris		
IRDye 680 Donkey Anti-rabbit	1:10000	LI-COR
IRDye 800 Donkey Anti-mouse	1:10000	LI-COR

2.4.5. Inhibició de l'expressió gènica utilitzant la tècnica de shRNA

Per tal d'inhibir l'expressió del gen problema es va utilitzar la tecnologia MISSION® shRNA de SIGMA-ALDRICH®. Aquesta tecnologia consisteix en l'ús de constructes shRNA predissenyats per ser complementaris a la seqüència del gen problema. Aquests shRNAs estan clonats en un vector lentiviral pLKO.1-puro. El mapa del plàsmid o vector per inhibir el gen d'interès i el mapa del plàsmid control estan descrits a la **Figura 19**.

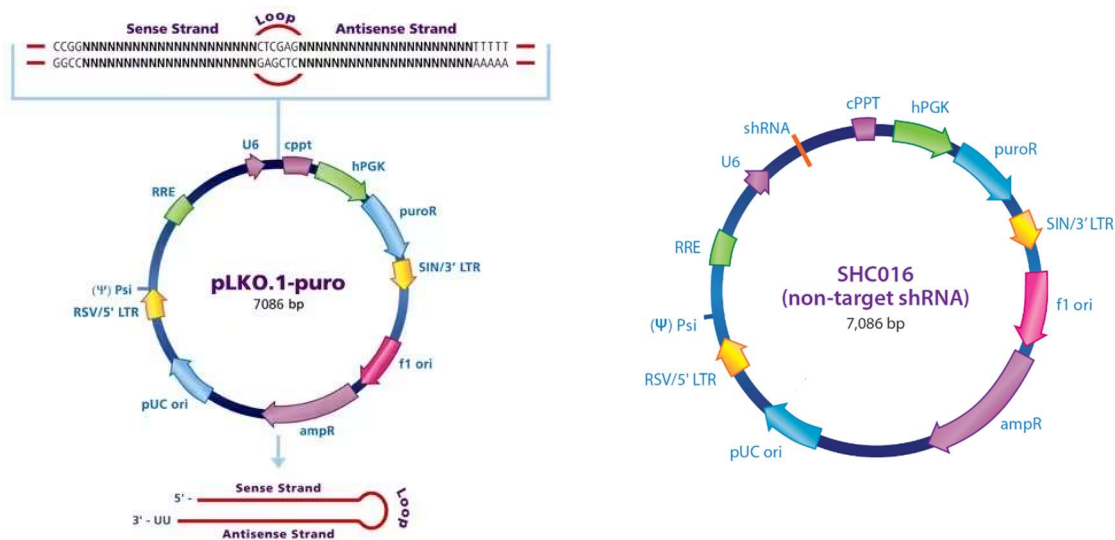


Figura 19. Mapa del plàsmid pLKO.1 utilitzat per inhibir el gen d'interès (esquerra) i el mapa del plàsmid control (*Non-Target*) (dreta). El plàsmid pLKO.1-puro presenta un gen de resistència a puromicina i ampicil·lina per a la seva selecció.

Per determinar les millors condicions d'inhibició del gen, es van utilitzar 5 constructes diferents, la seqüència dels quals està descrita a la **Taula 9**. Com a plàsmid control es va utilitzar MISSION® *pLKO.1-puro Non-Target shRNA Control Plasmid DNA* (SIGMA-ALDRICH®), *Non-Target* (NT) a partir d'ara. Aquest plàsmid NT, conté un insert amb el mateix nombre de parell de bases que els constructes d'interès, però que no és

codificant, per així poder descartar posteriorment les alteracions produïdes pel propi procés de transfecció (**Figura 19 i Taula 9**).

Taula 9. Seqüències dels constructes utilitzats per inhibir el gen problema (SPOCK1) obtingudes a SIGMA-ALDRICH®.

Constructes de SPOCK1	Referència	Seqüència
Constructe 93	TRCN0000053593	CCACGGCAATTTCTAGACAA
Constructe 94	TRCN0000053594	CGGTGTAATGAGGAGGGCTAT
Constructe 95	TRCN0000053595	CTGCTGGATGACCTAGAATAT
Constructe 96	TRCN0000053596	GCTTTCGAGACGATGATTATT
Constructe 97	TRCN0000053597	CCCTTCAGAGATCAATGCCAT
<i>Non-Target</i>	SHC016	GCGCGATAGCGCTAATAATTT

Amplificació del plàsmid: els plàsmids comercials predissenyats es van obtenir en forma d'estoc de glicerol, que permet la preservació i emmagatzematge a llarg termini de bacteris que contenen el vector lentiviral amb el clon shRNA incorporat (*MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock* (SHCLNG, MERK)). Per amplificar els plàsmids d'interès, es van incubar els bacteris en medi LB sense antibiòtic i en agitació a 37°C durant 15-30 minuts. Posteriorment, uns 15-20 µl d'aquests bacteris es van sembrar en plaques d'agar amb 100 µg/ml d'ampicil·lina i es va incubar tota la nit a 37°C, per a seleccionar aquells plàsmids que havien incorporat el constructe. L'extracció dels plàsmids es va dur a terme utilitzant el kit *Nucleospin Plasmid EasyPure* (Macherey-Nageli), seguint el protocol del fabricant, i es va quantificar mitjançant Nanodrop.

Producció de lentivirus amb el plàsmid d'interès: per a la seva producció, es van adquirir dos plàsmids addicionals necessaris per formar l'embolcall del virus: psPAX2 (Addgene # 12260), plàsmid d'embolcall lentiviral de segona generació, i pVSVg (Addgene # 8454), plàsmid d'envoltori per la producció lentiviral. Les cèl·lules productores de lentivirus (293T) es van transfectar mitjançant lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) en OptiMEM (Gibco, Invitrogen). També es van afegir els corresponents plàsmids amb els constructes per inhibir el gen problema o bé amb el NT, així com els plàsmids de formació d'embolcall (Pax2 i VSVg), necessaris per a la correcta transfecció posterior. La quantitat total de plàsmid utilitzada va ser de 3,2 µg a una ràtio 1:1:1 de cadascun dels plàsmids esmentats. Després de 48h, el sobrenedant que contenia els virus es va filtrar amb filtres de 45 micres.

Transfecció a les cèl·lules IGR37-R1 i selecció amb Puomicina: el sobrenedant filtrat juntament amb medi fresc a una ràtio 1:1 i 8 µg/mL de Polybrene es va afegir a les cèl·lules IGR37-R1, sembrades a una confluència del 80%, i es va incubar durant 24h.

Seguidament, es van deixar 48h amb medi nou i posteriorment es va començar amb la selecció amb Puromicina, a 2 µg/mL. Les cèl·lules supervivents eren les que havien estat transfectades amb èxit. Posteriorment, la inhibició del gen problema es va confirmar mitjançant RT-qPCR i Western Blot. Els valors d'expressió procedents de 3 experiments independents es van representar en gràfics de barres i es van normalitzar a la condició NT, representant aquesta el 100% d'expressió. Es va realitzar una anàlisi estadística t-test no aparellada entre els valors de % d'inhibició mitjançant el programari GraphPad Prism, considerant un p-valor inferior a 0,05 com a estadísticament significatiu.

2.4.6. Anàlisi de la reversió de resistència a inhibidors de BRAF+MEK

Per a l'anàlisi de l'efecte de la inhibició del gen problema en la reversió de resistència a la combinació de dabrafenib i trametinib es van fer assajos de viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig de citotoxicitat cel·lular MTT, un procediment semblant al de l'apartat 2.2 (Metodologia). En aquesta ocasió, breument, es van sembrar 2000 cèl·lules per pou i a les 24h es van tractar amb les dilucions dels fàrmacs. El sisè dia de tractament es va testar l'efecte dels fàrmacs en la viabilitat cel·lular. Per estudiar l'efecte de la inhibició del gen en la resensibilització al tractament, es va seguir la metodologia descrita en l'apartat 2.2.

2.4.7. Anàlisi de la proliferació cel·lular

Amb l'objectiu d'analitzar l'efecte de la inhibició del gen problema en la proliferació cel·lular, es van fer assajos de viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig de citotoxicitat cel·lular MTT. Es van comparar les línies amb el gen problema inhibit amb el respectiu control. Breument, es van sembrar 6000 cèl·lules en plaques de 96 pous i a les 24h, 48h i 72h es va afegir la solució de MTT (10% de MTT, 10% de FBS i del 80% de medi RPMI no suplementat). Després d'una incubació de 4 hores a 37°C i 5% de CO₂, les cèl·lules es suplementaven amb 100µl d'una solució de 0.1% SDS en HCl 0,01M. Finalment, es mesurava la densitat òptica (OD) a 570nm després d'una incubació tota la nit a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Per a cada línia es van incloure 16 rèpliques experimentals i la mitja de les OD corresponents al punt temporal de 48h i 72h es va normalitzar respecte a la mitja de les OD del punt temporal de les 24h. Els resultats procedents de 3 experiments independents es van representar utilitzant el programari GraphPad Prism, en un gràfic de barres on s'indicava la mitja i la desviació estàndard. Les diferències entre condicions a comparar en cada punt temporal es van calcular mitjançant un t-test no aparellat, considerant un p-valor inferior a 0,05 com a estadísticament significatiu.

2.4.8. Anàlisi de la capacitat de migració cel·lular

2.4.8.1. Tècnica de *transwell*

Per portar a terme l'estudi de migració cel·lular es va utilitzar el mètode *transwell*, que consisteix en una placa de 96 pous formats per dues càmeres, la inferior i la superior, separades per una membrana de polièster amb porus de 8 µm (HTS Transwell® polyester membrane tissue culture treated; Corning, NY, USA). Es van sembrar 4×10^5 cèl·lules, per a cada condició a comparar (*línia transfectada* vs controls), a la cambra superior en medi DMEM suplementat amb 2% de FBS. D'altra banda, a la cambra inferior es va afegir medi DMEM suplementat amb 10% de FBS per tal de crear un gradient. Per cada condició es van utilitzar 8 pous. Després d'incubar les cèl·lules durant 24h a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂, les cèl·lules que havien migrat a la càmera inferior es van fixar amb PFA 4%, tenyir amb Cristall Violeta al 0,5% i llegir mitjançant un microscopi òptic Leica DMI6000 B (x4 augments, NIS-Element). La quantificació de la capacitat de migració de cada condició es va analitzar amb el programa ImageJ. Els resultats procedents de 3 experiments independents es van representar utilitzant el programari GraphPad Prism en un gràfic de barres on s'indicava la mitja i la desviació estàndard. Les diferències entre condicions a comparar es van calcular mitjançant un t-test no aparellat, considerant un p-valor inferior a 0,05 com a estadísticament significatiu.

2.4.8.2. Assajos de *wound healing*

Per realitzar aquest assaig, es van sembrar les línies cel·lulars corresponents a les condicions a comparar en plaques de 6 pous fins arribar a una confluència del 90%. Llavors, es va realitzar una ratlla amb una punta de 1ml en la monocapa de cèl·lules adherides per a crear un espai lliure de cèl·lules i poder estudiar la migració de les cèl·lules restants, que es van incubar a 37°C sota una atmosfera de 5% de CO₂ durant diferents temps. Finalment, es van adquirir imatges per calcular l'àrea d'obertura de la ferida a temps 0h, 6h, 8h i 12h, usant el temps 0h com a 100% d'obertura i considerant com a major taxa de migració una superfície d'obertura inferior. Les imatges es van analitzar amb el programa Image J utilitzant la macro *Wound_healing_size_tool* (279). Els resultats d'àrea d'obertura, procedents de 3 experiments independents, es van representar utilitzant el programari GraphPad Prism en un gràfic de barres on s'indicava la mitja i la desviació estàndard. Les diferències entre condicions a comparar en cada punt temporal es van calcular mitjançant un t-test no aparellat, considerant un p-valor inferior a 0,05 com a estadísticament significatiu.

2.4.9. Anàlisi de la capacitat d'invasió cel·lular

Pels experiments d'invasió cel·lular es va utilitzar el mateix mètode *transwell* (HTS *Transwell® polyester membrane tissue culture treated*; Corning, NY, USA) que el descrit en l'apartat 2.4.8.1. amb la diferència que en aquest cas es va utilitzar una capa de 21µl de *Matrigel® Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced* (Corning®) sobre la membrana de la cambra superior. Breument, es van sembrar 4×10^5 cèl·lules, per a cada condició a comparar (*línia transfectada* vs controls), a la cambra superior en medi DMEM suplementat amb 2% de FBS i a la cambra inferior es va afegir medi DMEM suplementat amb 10% de FBS per tal de crear un gradient. L'experiment es va finalitzar a les 48h amb la fixació i la tinció de les cèl·lules migrades a la cambra inferior, seguint el protocol l'explicat a l'apartat 2.4.8.1. Els resultats procedents de 3 experiments independents es van representar utilitzant el programari GraphPad Prism en un gràfic de barres on s'indicava la mitja i la desviació estàndard. Les diferències entre condicions es van calcular mitjançant un t-test no aparellat, considerant un p-valor inferior a 0,05 com a estadísticament significatiu.

Resultats

RESULTATS ESTUDI I

Identificació de biomarcadors moleculars per discriminar aquells pacients de melanoma metastàtic *BRAF* mutat que experimentaran benefici clínic i resposta completa a la teràpia dirigida i no a la immunoteràpia

1. Inclusió dels pacients i característiques de la cohort retrospectiva

Finalment, un total de 27 pacients es va incloure en l'anàlisi de la cohort retrospectiva d'aquest estudi. En un inici, es van considerar 45 pacients però es van haver d'excloure 16 pacients de l'estudi pels següents motius: (i) mostres que es van descartar pel patòleg i/o faltava firmar el consentiment informat (CI) (9 casos); (ii) mostres que no passaven els controls de qualitat de la mostra una vegada s'havia realitzat l'extracció de l'ARN (5 casos); (iii) mostres que es van incloure en l'anàlisi d'expressió però es van descartar perquè no complien els controls de qualitat establerts per Nanostring® (4 casos) (**Figura 20**).

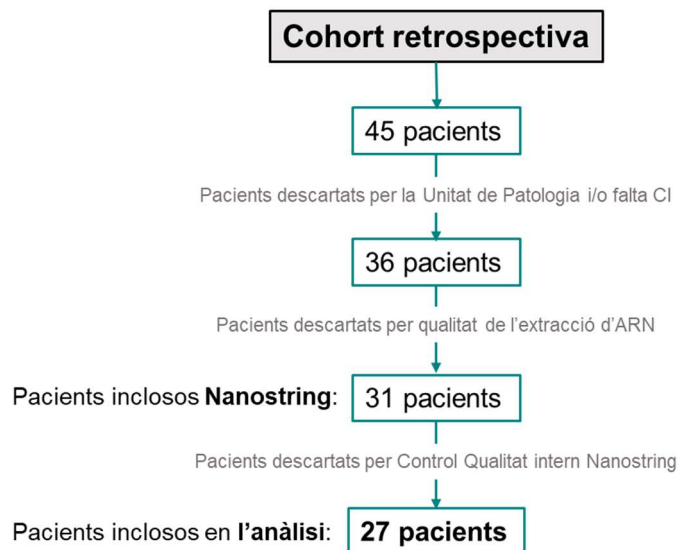


Figura 20. Diagrama de pacients inclosos en la cohort retrospectiva. CI = consentiment informat.

1.1. Característiques clíniques de la cohort retrospectiva

Les característiques clíniques més importants de la cohort dels 27 pacients inclosos en l'anàlisi d'expressió per Nanostring® estan descrites a la **Taula 10**. Breument, la mitjana de l'edat era de 53,81 anys i el 66,7% eren homes. D'aquesta cohort, 19 pacients van ser tractats amb inhibidors de BRAF+MEK (70,3%) i 8 van ser tractats amb immunoteràpia (29,6%).

Taula 10. Característiques clíniques de la cohort retrospectiva de l'estudi.

	N = 27	N (%)		N (%)
Sexe			Estat supervivència	
	Home	18 (66.7%)		Viu 8 (29.6%)
	Dona	9 (33.3%)		Exitus 19 (70.4%)
Edat			Millor resposta	
	< 60	15 (55.6%)	<u>Cohort BRAF+MEKi:</u>	N = 19
	> 60	12 (44.4%)		NR 6 (32%)
LDH (U/l)				RP 9 (47%)
	<300	18 (66.7%)		RC 4 (21%)
	>300	8 (26.6%)	<u>Cohort immunoteràpia:</u>	N = 8
	N/A	1 (3.7%)		NR 4 (50%)
Breslow (mm)				RP 2 (25%)
	1 - 4	7 (25.9%)		RC 2 (25%)
	>4	7 (25.9%)	Nivell de benefici clínic	
	N/A	13 (48.1%)	<u>Cohort BRAF+MEKi:</u>	N = 19
Clark				Alt 9 (47%)
	IV	12 (44.4%)		Baix 10 (53%)
	V	2 (7.4%)	<u>Cohort immunoteràpia:</u>	N = 8
	N/A	13 (48.1%)		Alt 4 (50%)
Ulceració				Baix 4 (50%)
	Si	4 (14.8%)	Tractament	
	No	7 (25.9%)	<u>Cohort BRAF+MEKi:</u>	N = 19
	N/A	16 (59.3%)		Dabrafenib+Trametinib 12 (63%)
Progressió				Altres 7 (37%)
	Si	18 (66.7%)	<u>Cohort immunoteràpia:</u>	N = 8
	No	9 (33.3%)		Pembrolizumab 5 (62.5%)
				Nivolumab 2 (25%)
				Ipilimumab 1 (12.5%)
			Mediana (rang)	
TLP (mesos)				11,9 (4,7-19,2)
SG (mesos)				15,2 (5,1-25,3)
RC = Resposta Completa; RP = Resposta Parcial; NR = No Resposta; TLP = Temps lliure de progressió;				
SG = Supervivència global; N/A = no aplicable				

Del subgrup de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK, un 63% es va tractar amb la combinació dabrafenib + trametinib. Del subgrup de pacients tractats amb immunoteràpia el 62% es va tractar amb pembrolizumab, el 25% amb nivolumab i només 1 cas amb ipilimumab. Pel que fa a la resposta al tractament, determinada a partir dels criteris RECIST 1.1, dels 19 pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK, el 47% va presentar una resposta parcial (RP), el 21% va presentar una resposta completa (RC), el 32% no van respondre a la teràpia i es va considerar que un 47% va experimentar un alt benefici clínic. D'altra banda, dels pacients tractats amb immunoteràpia, el 25% va presentar una RP, el 25% una RC i un 50% no van respondre al tractament, considerant que un 50% dels pacients presentava un alt benefici clínic. A més a més, a la **Taula 10** també queden recollides algunes variables clíniques i histopatològiques amb valor pronòstic: nivells de LDH en sang, així com gruix de Breslow, índex de Clark i la ulceració al diagnòstic.

L'estat de supervivència de la cohort era del 70,4% de casos *exitus* i un 66,7% de progressions al tractament. La mediana del TLP d'aquesta cohort era de 11,9 mesos i la mediana de la SG era de 15,2 mesos (**Figura 21**).

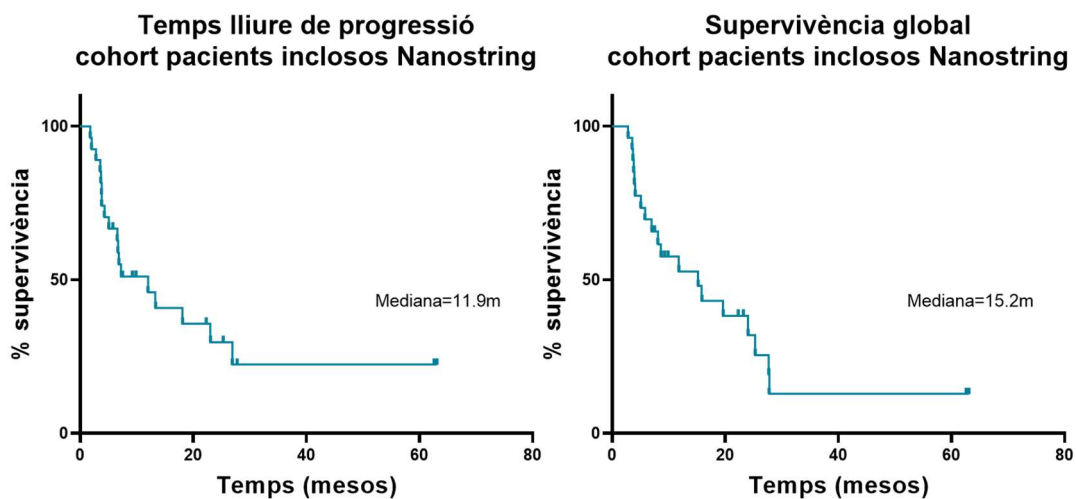


Figura 21. Corbes de supervivència Kaplan-Meier del TLP i la SG de la cohort retrospectiva (N = 27). Em ambdós gràfics es representa el temps amb mesos (m).

Mitjançant l'anàlisi pel test Txi-quadrat o Fisher, no hem identificat diferències significatives entre les dues cohorts de tractament (teràpia dirigida vs immunoteràpia) per a cada variable clínica i histopatològica, exceptuant la variable de l'estat de supervivència: els casos *exitus* eren més elevats en la cohort tractada amb teràpia dirigida (**Taula 11**). Això es podria explicar, en part, perquè presenta un temps des del

diagnòstic més llarg ($p=0,03$). És a dir, que en la cohort de teràpia dirigida hi havia un rang de seguiment major que en la d'immunoteràpia. Referent al TLP i a la SG, no hi havia diferències significatives entre les dues cohorts.

Taula 11. Característiques clíniques estratificades per cohorts de tractament.

	N = 27	N (%)	Cohorts de tractament		p-valor
			Teràpia dirigida N = 19	Immunoteràpia N = 8	
Sexe	Home	18 (66,7%)	11 (57,9%)	7 (87,5%)	0,21
	Dona	9 (33,3%)	8 (42,1%)	1 (12,5%)	
Edat	<60	15 (55,6%)	12 (63,1%)	3 (37,5%)	0,39
	>60	12 (44,4%)	7 (36,8%)	5 (62,5%)	
LDH (U/l)	<300	18 (66,7%)	12 (63,1%)	6 (85,7%)	0,37
	>300	8 (26,6%)	7 (36,8%)	1 (14,3%)	
	N/A	1 (3,7%)			
Breslow (mm)	1-4	7 (25,9%)	7 (53,8%)	0 (0%)	1
	>4	7 (25,9%)	6 (46,2%)	1 (100%)	
	N/A	13 (48,1%)			
Clark	IV	12 (85,7%)	11 (84,6%)	1 (100%)	0,67
	V	2 (14,3%)	2 (15,4%)	0 (0%)	
	N/A	13 (48,1%)			
Ulceració	Si	4 (36,4%)	3 (30%)	1 (100%)	0,36
	No	7 (63,6%)	7 (70%)	0 (0%)	
	N/A	13 (48,1%)			
Progressió	Si	18 (66,7%)	14 (73,7%)	4 (50%)	0,37
	No	9 (33%)	5 (26,3%)	4 (50%)	
Estat supervivència	Viu	8 (29,6%)	2 (10,5%)	6 (75%)	0,002**
	Exitus	19 (70,4%)	17 (89,5%)	2 (25%)	
Millor Resposta	RC	6 (22,2%)	4 (21%)	2 (25%)	0,53
	RP	11 (40,7%)	9 (47,3%)	2 (25%)	
	NR	10 (37%)	6 (31,6%)	4 (50%)	
Benefici clínic	Alt	13 (48,1%)	9 (47,3%)	4 (50%)	1
	Baix	14 (51,9%)	10 (52,6%)	4 (50%)	
		Mediana (rang)	Tractament		
			Teràpia dirigida	Immunoteràpia	p-valor
Temps al diagnòstic (anys)		7,7 (2,5-11,8)	8,3 (6,1-10,6)	5,7 (2,5-11,8)	0,03*
TLP (mesos)		11,9 (4,7-19,2)	11,9 (3,2-20,7)	4,3 (N/A)	0,87
SG (mesos)		15,2 (5,1-25,3)	11,8 (1,6-22)	N/A	0,28

p-valor de l'anàlisi per test Txi-Quadrat o Fisher; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001
LDH = lactat deshidrogenasa; N/A = no aplicable; RC = Resposta Completa; RP = Resposta Parcial; NR = No Resposta;
SG = Supervivència global; TLP = Temps lliure de progressió

1.2. Anàlisi de la supervivència en funció de les variables clíniques i histopatològiques de la cohort retrospectiva

Per tal de determinar si les variables clíniques i histopatològiques de la cohort retrospectiva tenien un impacte en el TLP i la SG, es va realitzar una anàlisi univariada mitjançant un test de regressió de Cox (**Taula 12**). Es van analitzar les següents variables dicotomitzades: sexe, edat, nivells de LDH, gruix de Breslow, índex de Clark i ulceració. Cap d'aquestes variables tenia un impacte significatiu en la supervivència en la nostra cohort global, no demostrant valor pronòstic. D'altra banda, també es van analitzar les variables d'eficàcia: millor resposta al tractament i benefici clínic. Aquestes sí que van mostrar un impacte significatiu en la supervivència, essent favorables per a uns millors TLP i SG, assolir una resposta tumoral al tractament, així com obtenir benefici clínic.

Taula 12. Anàlisi univariada per Regressió de Cox de la cohort retrospectiva.

Variables clíniques i factors pronòstics	Temps lliure de progressió		Supervivència global	
	HR (95% CI)	p-valor	HR (95% CI)	p-valor
Sexe (Home/Dona)	0,6 (0,23-1,56)	0,29	0,47 (0,18-1,19)	0,11
Edat (<60/>60)	1,28 (0,45-3,12)	0,61	1,13 (0,442-2,867)	0,80
LDH (<300/>300 U/l)	1,21 (0,49-3,3)	0,72	1,62 (0,59-4,39)	0,34
Breslow (1-4/>4mm)	0,75 (0,2-2,81)	0,67	0,86 (0,24-2,99)	0,81
Clark (IV/V)	35,79 (0,05-25308)	0,28	0,21 (0,02-1,79)	0,15
Ulceració (Si/No)	1,25 (0,29-5,26)	0,76	1,34 (0,3-6,1)	0,70
Variables d'eficàcia				
Millor resposta (NR/R)	5,69 (2,14-15,13)	0,0004***	0,051 (1,38-6,73)	0,006**
Benefici clínic (No/Sí)	6,19 (1,19-32,01)	0,03*	2,24 (1,43-3,52)	0,0004***

p-valor de l'anàlisi univariada per Regressió de Cox, representat per HR (95%CI) = Hazard Ratio (95% interval de confiança); *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es consideren estadísticament significatius. LDH = lactat deshidrogenasa.

2. Anàlisi dels gens diferencialment expressats segons el benefici clínic en la cohort retrospectiva estratificada per tractaments: inhibidors de BRAF+MEK i immunoteràpia

Per tal d'identificar els gens diferencialment expressats segons el benefici clínic per a cada cohort de tractament, us va utilitzar el panell nCounter® PanCancer IO 360™ de Nanostring®, el qual avalua l'expressió gènica de 770 gens associats al tumor, el microambient tumoral i la resposta immune. En primer lloc, es van seleccionar els gens diferencialment expressats entre el grup de pacients que presentaven alt benefici clínic respecte els que presentaven baix benefici clínic (**Figura 22**), seguint els criteris de selecció descrits en l'apartat 1.3.3 de Materials i mètodes (p -valor ajustat $<0,05$ i $\log_2(FC) < 1,5$ o $< -1,5$). El llistat de gens que acomplien aquests criteris en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK i en els tractats amb immunoteràpia, estan representats en la **Taula suplementària 1 i 2**, respectivament.

Així, els biomarcadors que complien els requisits descrits anteriorment en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK i que la seva expressió s'associava a un alt benefici clínic eren COL11A2, COMP, IL1B, MS4A6A i APLNR. Per altra banda, els que la seva expressió s'associava amb baix benefici clínic eren ITGB8, CDH2, DEFB134, CCL21, LIF i GHR (**Figura 22A**).

En el cas de la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia, els marcadors l'expressió que correlacionaven amb un alt benefici clínic eren WNT5B, HERC6, CD8B, CD19, CX3CL1, LTB i CCL21; i amb un baix benefici clínic, l'expressió de CCNA1, WNT2, ANGPT1, CXCL8 i TNFRSF10C (**Figura 22B**).

Degut a que una de les principals limitacions d'aquest estudi és la reduïda mida mostral de la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia (8 pacients), els resultats que es van considerar més robustos eren els obtinguts a partir de la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK. Llavors, l'estratègia que seguidament es va dur a terme va ser interrogar en la cohort d'immunoteràpia l'estat dels gens seleccionats prèviament en la cohort de tractament amb teràpia dirigida, per estudiar si també tenien un impacte en aquesta última.

Es van identificar un set de gens candidats: ITGB8 i DEFB134 estaven significativament associats a un baix benefici clínic en ambdues cohorts de tractament; l'expressió de CCL21 i GHR correlacionava significativament amb un baix benefici clínic en la cohort tractada amb teràpia dirigida però amb un alt benefici clínic en la d'immunoteràpia; finalment, la baixa expressió de CXCL8 correlacionava amb un baix benefici clínic en

teràpia dirigida, però sobretot s'associava significativament amb un alt benefici clínic davant el tractament amb immunoteràpia.

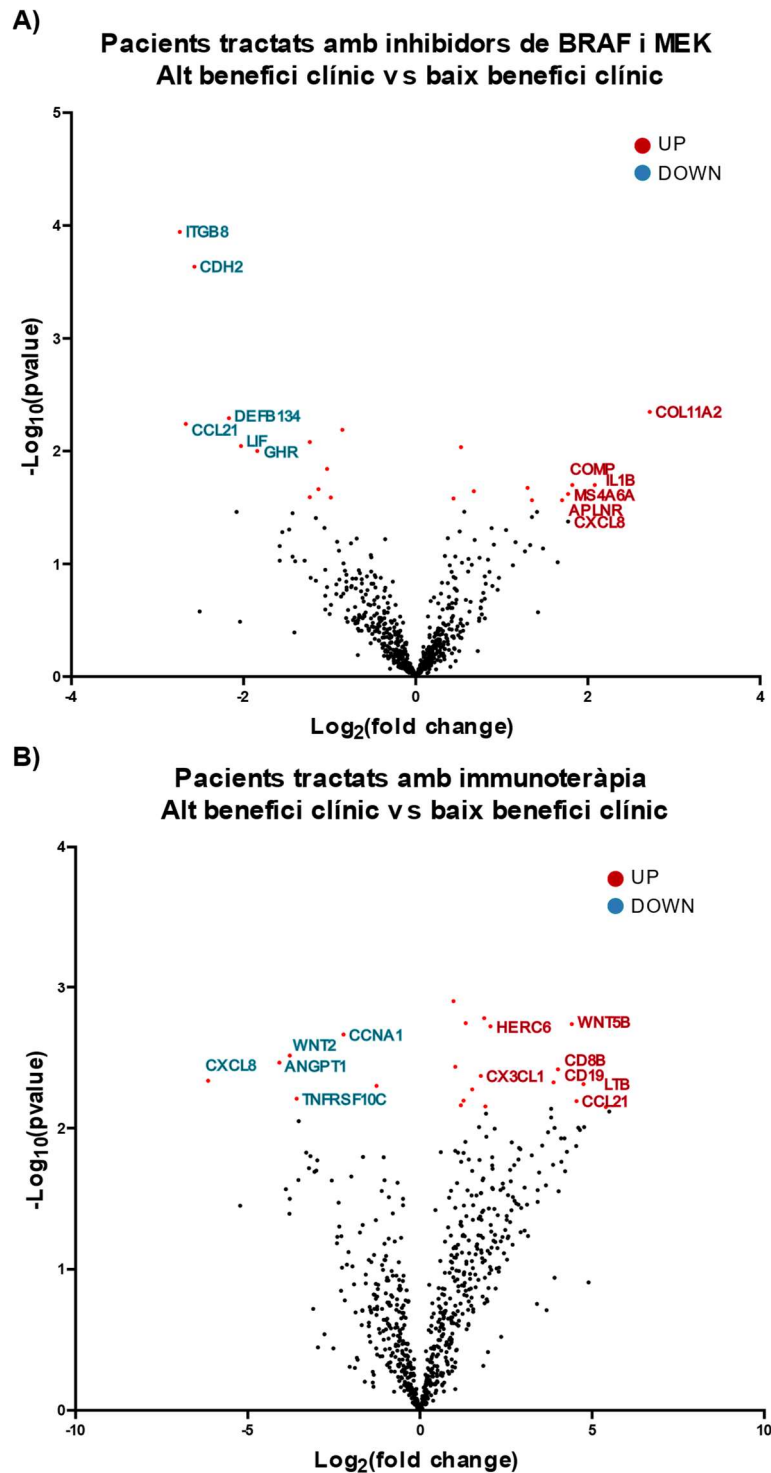


Figura 22. Representació *volcano plot* dels gens diferencialment expressats segons el nivell de benefici clínic en els pacients tractats amb **A)** inhibidors de BRAF+MEK i **B)** immunoteràpia. Els gens que compleixen els criteris de selecció (p -valor ajustat $< 0,05$) i $\log_2(FC) > 1,5$ o $> -1,5$ es representen en vermell (major expressió en el grup de pacients amb alt benefici clínic respecte els de baix) i en blau (menor expressió en el grup de pacients amb alt benefici clínic respecte els de baix).

2.1. Identificació de gens potencials factors pronòstic en ambdues cohorts de tractament

En aquest context, es va observar que l'elevada expressió de *integrin subunit beta 8* (ITGB8) i *Defensin Beta 134* (DEFB134) estava associada a un baix benefici clínic en ambdues cohorts de tractament, essent aquesta associació significativa en la cohort de pacients tractats amb teràpia dirigida (**Taula suplementària 1**), i observant-se una tendència en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia. Els nivells d'expressió dels gens per ambdues cohorts de tractament es representen a la **Figura 23**.

Entre la resta de gens analitzats en aquest context, l'elevada expressió de *CDH2* i *LIF* estava correlacionada de manera significativa amb un baix benefici clínic en la cohort de pacients tractats amb teràpia dirigida (**Taula suplementària 1**), però no mostraven cap tendència en la cohort d'immunoteràpia (**Figura suplementària 1**). De manera similar, malgrat la baixa expressió de *COL11A2*, *MS4A6A*, *COMP* i *APLNR* estava correlacionada amb un baix benefici clínic de manera significativa en la cohort de pacients tractats amb teràpia dirigida (**Taula suplementària 1**), no mostraven cap tendència en la cohort d'immunoteràpia (**Figura suplementària 2**).

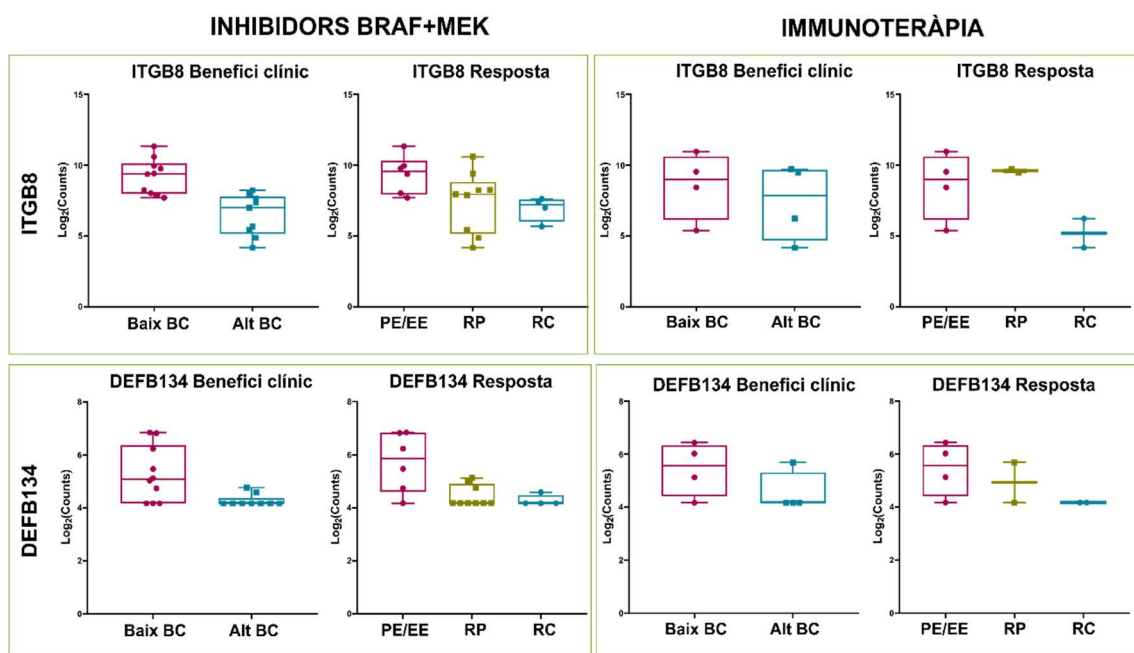


Figura 23. Representació en *box plot* dels nivells d'expressió de *ITGB8* i *DEFB134*, per grups de benefici clínic i la resposta al tractament en cada cohort de tractament. BC = Benefici Clínic; PE/EE = progressió/estabilització (no resposta); RP = resposta parcial; RC = resposta completa.

2.1.1. Impacte de *ITGB8* i *DEFB134* en la supervivència

Per tal de tenir una visió més completa de l'impacte pronòstic de *ITGB8* i *DEFB134* es va estudiar el TLP i la SG segons l'alta o baixa expressió d'aquests gens en la cohort

retrospectiva completa. El punt de tall per discriminar entre alta o baixa expressió es va determinar a partir d'un valor arbitrari, determinat com a millor punt de tall, que va ser la mediana. En l'anàlisi de supervivència, segons la funció log-rank (**Figura 24**) i l'anàlisi univariada de regressió de Cox (**Taula 12**), l'alta expressió de *ITGB8* i de *DEFB134*, es va correlacionar amb un TLP i una SG menys perllongada comparat amb els pacients amb baixa expressió (**Figura 24**), corroborant els nostres resultats anteriors del potencial paper d'ambdós gens com a factors de mal pronòstic.

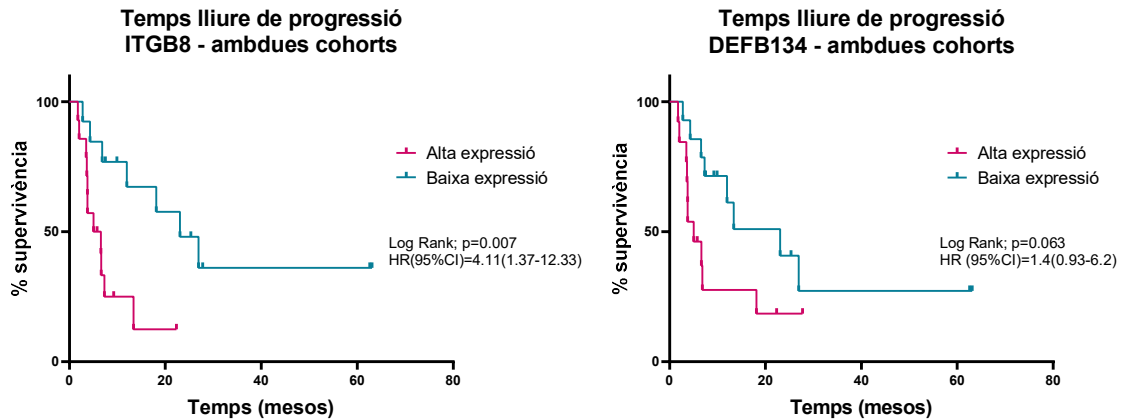


Figura 24. Corbes Kaplan-Meier del TLP de la cohort completa estratificant per alta o baixa expressió de *ITGB8* i *DEFB134*.

2.2. Identificació de biomarcadors com a potencials factors predictius d'expressió amb valor oposat entre ambdues cohorts de tractament per a la selecció de la millor opció terapèutica

En aquest context, es van identificar 3 biomarcadors: *C-C Motif Chemokine Ligand 21* (*CCL21*), *growth hormone receptor* (*GHR*), i *C-X-C Motif Chemokine Ligand 8* (*CXCL8*). L'elevada expressió de *GHR* i *CCL21* estava significativament relacionada amb un baix benefici clínic en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK (**Taula suplementària 1**) i, per contra, relacionada amb un alt benefici clínic en els pacients tractats amb immunoteràpia (**Taula suplementària 2**). Els nivells d'expressió en ambdues cohorts es representen a la **Figura 25**. En el cas de *CCL21*, és important destacar la clara associació amb experimentar respostes completes amb baixos i molt alts nivells d'expressió del gen en la cohort de teràpia dirigida i immunoteràpia, respectivament. En la primera, també és molt evident aquesta associació pel gen *GHR*. Addicionalment, també es va estudiar l'expressió de *CCL19*, ja que forma part del mateix eix de citokines que *CCL21*, en ambdues cohorts de tractament. *CCL19* anava en la mateixa direcció d'expressió que *CCL21*, encara que no de manera significativament estadística en la cohort tractada amb inhibidors de BRAF+MEK i amb d'immunoteràpia

($\text{Log}_2(\text{fold change}) = -1,05$; p-valor = 0,25 i $\text{Log}_2(\text{fold change}) = 4,9$; p-valor = 0,12, respectivament).

D'altra banda, es va correlacionar de manera significativa l'elevada expressió de *CXCL8* amb un baix benefici clínic en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia (**Taula suplementària 2**), i una expressió contrària en la cohort tractada amb teràpia dirigida (**Taula suplementària 1**). En el context de la resposta al tractament, s'observa una clara correlació entre aquesta i molt baixos nivells d'expressió de *CXCL8* en la cohort tractada amb immunoteràpia (**Figura 25**). També es va analitzar l'impacte del gen *ILB1* en aquest context, encara que no va mostrar patrons d'expressió clars entre grups d'eficàcia en cap de les dues cohorts de tractament (**Figura suplementària 3**).

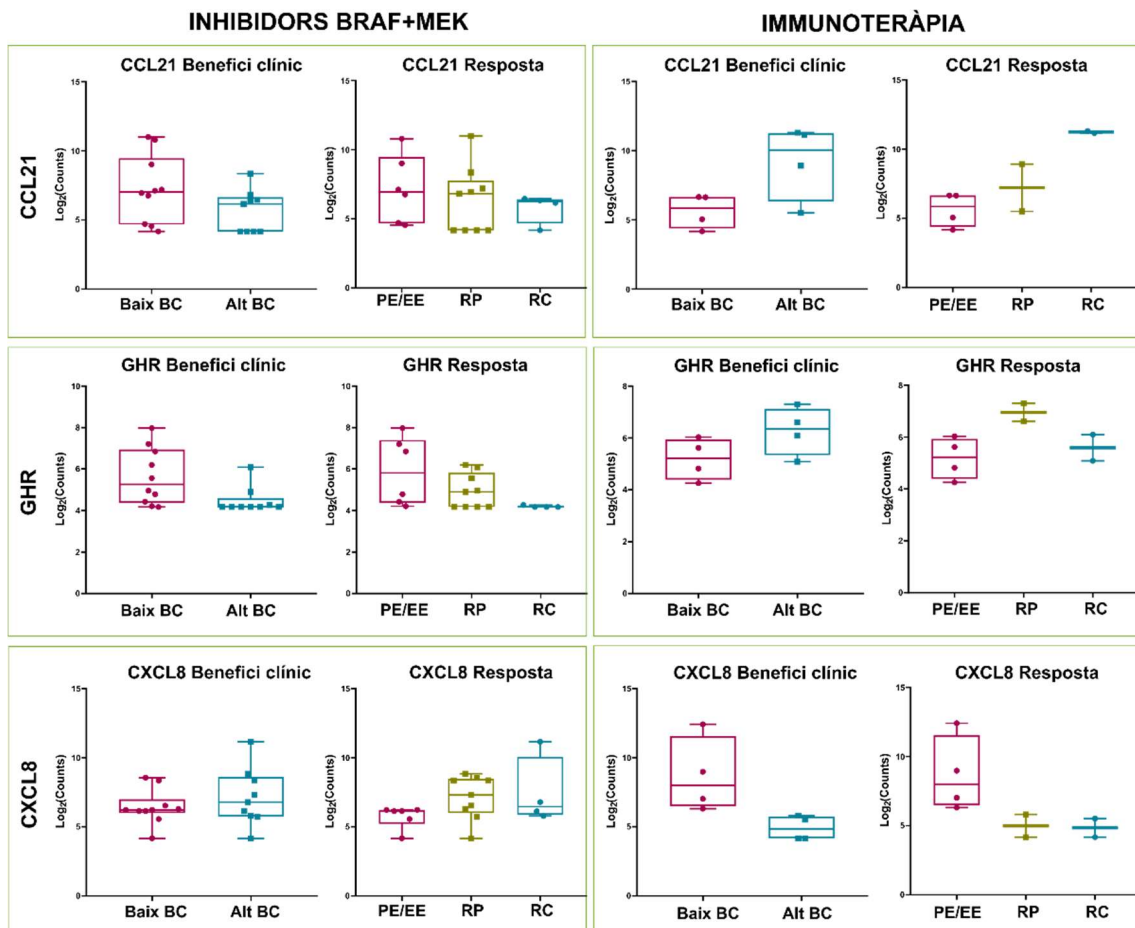


Figura 25. Representació en *box plot* dels nivells d'expressió de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8* estratificats per grups de benefici clínic i resposta terapèutica en cada cohort de tractament. BC = Benefici Clínic; PE/EE = progressió/estabilització (no resposta); RP = resposta parcial; RC = resposta completa.

2.2.1. Impacte de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8* en la supervivència

A partir d'aquí, es va estudiar el valor predictiu d'aquests biomarcadors a través del seu impacte en el TLP i la SG en cada cohort de tractament (**Figura 26**).

En línia amb els resultats mostrats anteriorment, la baixa expressió de *CCL21* i *GHR* es va correlacionar de manera significativa amb un TLP més perllongat en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK.

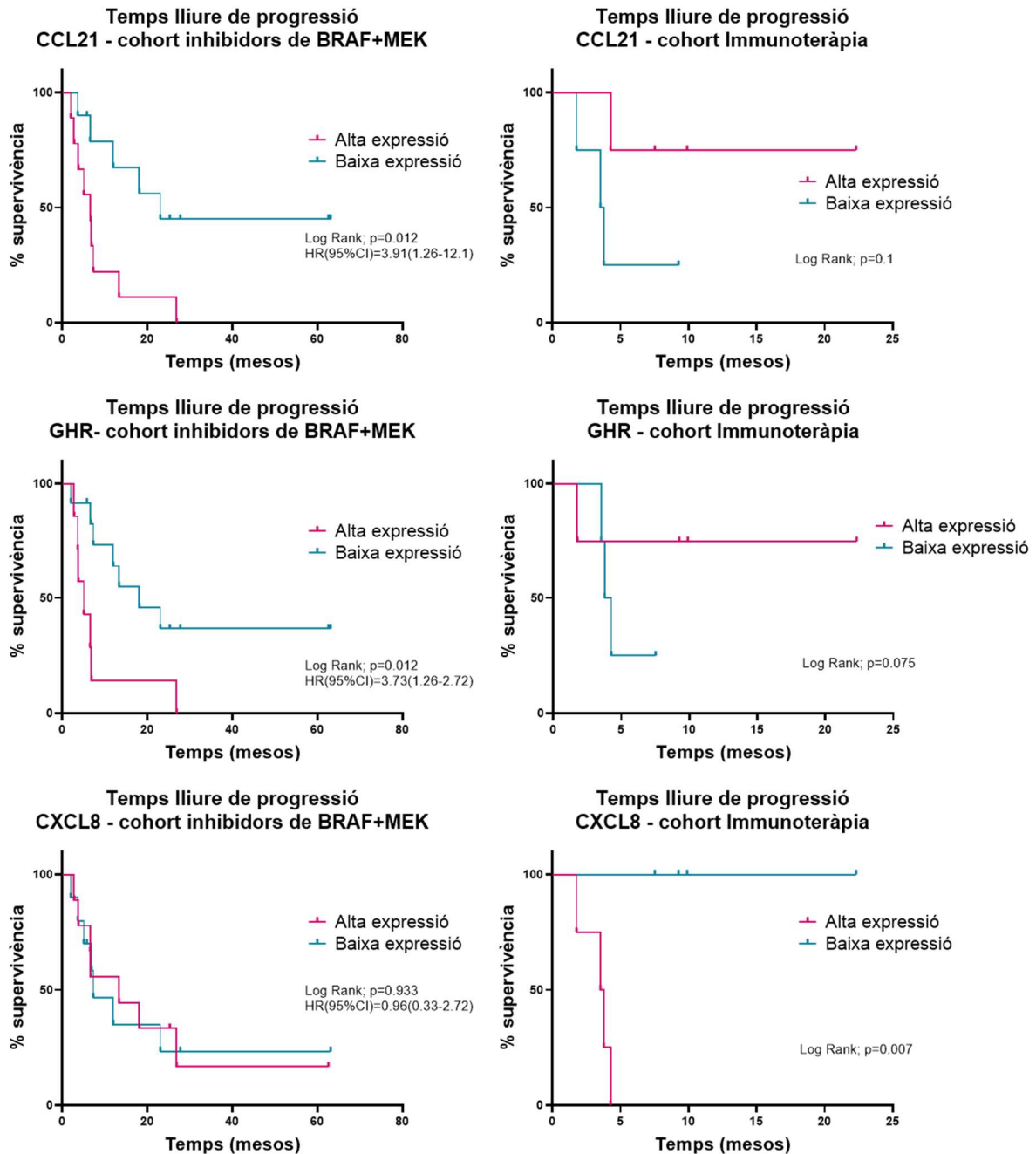


Figura 26. Corbes Kaplan-Meier del TLP en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK i la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia estratificant per alta o baixa expressió de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8*.

En la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia, la correlació era contrària, encara que a causa de la baixa mida mostral les diferències no eren estadísticament

significatives. D'altra banda, no s'observaven diferències quan es correlacionava el TLP amb l'expressió de *CXCL8* en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK. No obstant això, l'elevada expressió del biomarcador *CXCL8* es correlacionava de manera estadísticament significativa amb un major TLP en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia, no observant-se cap progressió en aquest subgrup (**Figura 26**). Paral·lelament, es van obtenir resultats equivalents per als 3 biomarcadors al valorar la SG (**Figura suplementària 4**). El valor predictiu dels biomarcadors sobre el TLP i la SG es va corroborar en l'anàlisi univariada mostrada en la **Taula 13**.

Taula 13. Anàlisi univariada per Regressió de Cox.

Variables moleculars	Temps lliure de progressió		Supervivència global	
	HR (95% CI)	p-valor	HR (95% CI)	p-valor
Cohort global (N = 27)				
Expressió ITGB8	4,11 (1,372-12,33)	0,01*	5,68 (1,72-18,73)	0,004***
Expressió DEFB134	1,4 (0,93-6,2)	0,07	3,04 (1,19-7,71)	0,02*
Cohort inhibidors de BRAF+MEK (N = 19)				
Expressió CCL21	3,91 (1,26-12,1)	0,02*	3 (1,1-8,3)	0,03*
Expressió GHR	3,73 (1,26-11,1)	0,02*	2,77 (0,99-7,68)	0,05
Expressió CXCL8	0,96 (0,33-2,72)	0,93	0,86 (0,33-2,25)	0,76
Cohort immunoteràpia (N = 8)				
Expressió CCL21	0,17 (0,02-1,77)	0,14	0,01 (0,00-1239)	0,44
Expressió GHR	0,15 (0,01-1,66)	0,12	NA	
Expressió CXCL8	NA	-	NA	-

p-valor de l'anàlisi univariada per Regressió de Cox, representat per HR (95%CI) = Harzard Ratio (95% interval de confiança); *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es consideren estadísticament significatius. NA = no aplicable a causa de la falta d'events, per una N limitada.

2.3. Validació de la capacitat predictiva de selecció de la millor opció terapèutica dels 3 biomarcadors en forma de signatura

El següent que vam voler estudiar va ser la capacitat de predicció d'aquests tres biomarcadors com a signatura, per a seleccionar el millor tractament a administrar en cada cas. A la **Taula 14** estan descrits els grups d'expressió dels 3 biomarcadors, considerats com a favorables quant a obtenció de benefici clínic, segons els criteris establerts per a cada cohort de tractament. Els grups d'expressió per gen estan dicotomitats d'acord amb els usats en l'anàlisi de supervivència anterior.

Taula 14: Factors favorables per a cada biomarcador segons la cohort de tractament.

Classificació	Inhibidors de BRAF+MEK	Immunoteràpia
CCL21	Baixa expressió	Alta expressió
GHR	Baixa expressió	Alta expressió
CXCL8	Alta expressió	Baixa expressió

Per estudiar la capacitat predictiva de la signatura formada pels tres biomarcadors combinats, es van analitzar les corbes de supervivència Kaplan-Meier per al TLP segons l'estat favorable o desfavorable dels 3 gens, establint les següents categories: tots els biomarcadors són favorables, dos són favorables, un és favorable o tots són desfavorables. Tant en la cohort conjunta, com en l'estratificada per tipus de tractament, tenir els 3 biomarcadors favorables va predir la resposta, amb un TLP més perllongat. Curiosament, la disminució del TLP disminuïa en correlació amb la pèrdua de biomarcadors en estat favorables. També es van analitzar les cohorts de tractament per separat i els resultats eren similars (**Figura 27**).

En aquest escenari, i a través de l'anàlisi per corbes ROC, els tres biomarcadors com a signatura presentaven una AUC de 0,88 ($p = 0,004$), amb un bon valor predictiu positiu (VPP) de 77,8% i un valor predictiu negatiu (VPN) del 80%. Aquesta anàlisi es va portar terme només per a la cohort de pacients tractats amb teràpia dirigida, ja que la mida de la cohort d'immunoteràpia era molt reduïda per obtenir resultats robustos. A causa que *CXCL8* no semblava tenir un gran impacte en aquesta cohort d'anàlisi (veure **Figura 26**; esquerra-inferior), també es va analitzar la capacitat predictiva d'utilitzar només *CCL21* + *GHR* per determinar si la signatura tenia potència predictiva amb el mínim de biomarcadors. Els resultats de l'AUC i p-valor van ser els mateixos en ambdues anàlisis. En canvi, el VPP i VPN en utilitzar tres biomarcadors (VPP = 77,8% i VPN = 80%) presentava un avantatge respecte utilitzar dos biomarcadors (VPP = 70% i VPN = 77,8%) (**Figura 28A-B**).

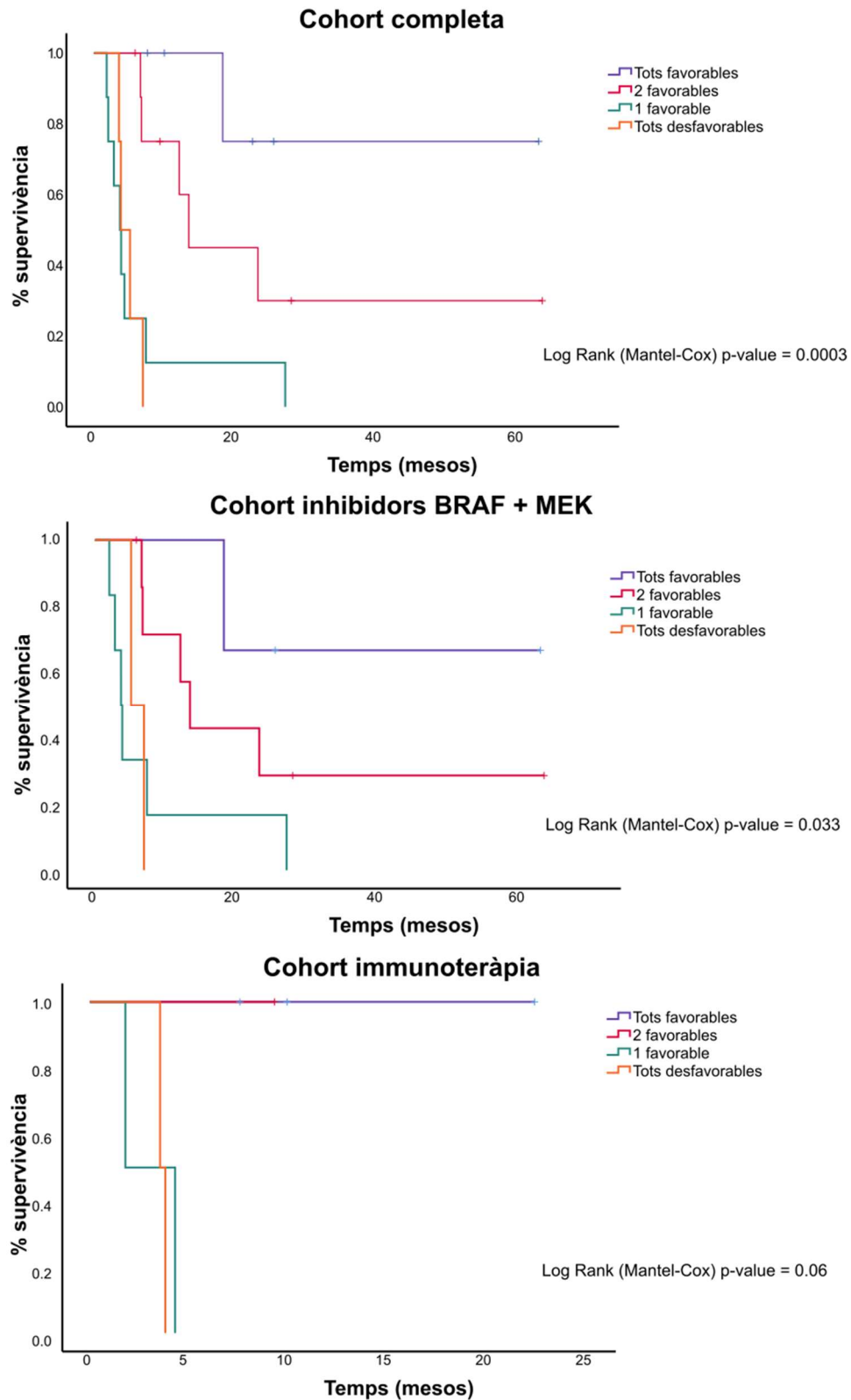


Figura 27. Corbes Kaplan-Meier del TLP de la signatura dels 3 biomarcadors (*CCL21*, *GHR* i *CXCL8*) segons les següents categories: tots favorables, 2 o 1 favorables o tots desfavorables. Es representa la cohort completa (N = 27; superior) i per tractaments: teràpia dirigida (N = 19; central) i immunoteràpia (N = 8; inferior). El p-valor es deriva de la funció log-rank i es considera marginalment significatiu ($p > 0,05$ i < 1) o significatiu ($p < 0,05$).

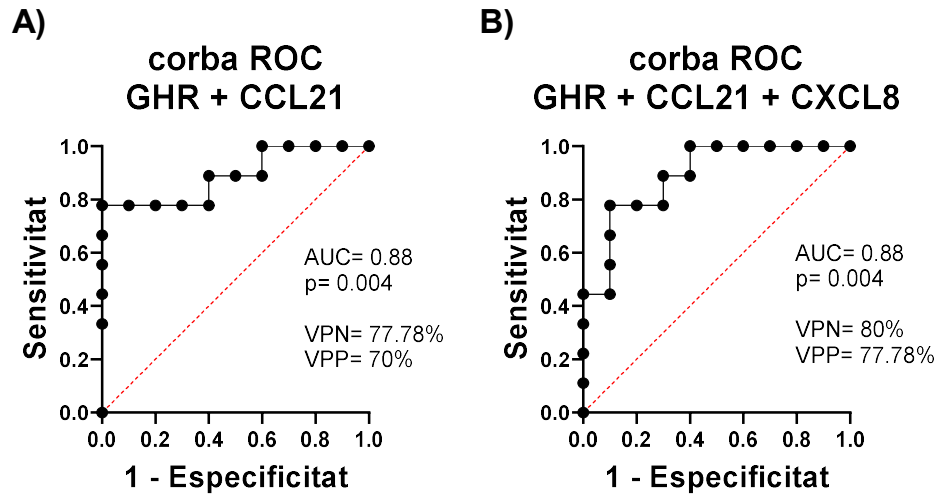


Figura 28. Corbes ROC de la signatura utilitzant els dos biomarcadors *GHR + CCL21* (A) i la signatura utilitzant 3 biomarcadors *GHR + CCL21 + CXCL8* (B) en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK.

3. Validació de la signatura de 3 biomarcadors en una cohort independent de pacients amb melanoma *BRAF* mutat tractats amb inhibidors de BRAF+MEK o immunoteràpia

3.1. Inclusió dels pacients i característiques de la cohort prospectiva

Es tracta d'una cohort independent, recollida de forma prospectiva durant el període des de l'any 2020 al 2023. En aquesta cohort, els pacients van rebre teràpia dirigida pal·liativa (4 pacients) o immunoteràpia en règim adjuvant (14 pacients) o pal·liatiu (8 pacients). Les característiques clíniques més importants de la cohort prospectiva estan descrites a la **Taula 15**. Es va calcular la SLR, amb una mediana de 9,71 mesos, per a la cohort adjuvant, i el TLP per a la cohort pal·liativa, amb una mediana de 3,8 mesos.

Del subgrup de pacients tractats amb immunoteràpia adjuvant (N=14), el 57,1% van sofrir una recaiguda de la malaltia. La majoria dels pacients eren estadi IIIB-C en el moment del diagnòstic, un 64% presentaven tumors amb un Breslow superior a 4 mm, i un 57% estaven ulcerats.

Dels pacients tractats en règim pal·liatiu, el 67% van rebre immunoteràpia i el 62,5% d'aquests no va mostrar benefici clínic. Només 4 pacients van ser tractats amb inhibidors de BRAF+MEK, dels quals 3 casos va presentar una NR al tractament.

A més a més, a la **Taula 15** també queden recollides les següents variables clíniques i histopatològiques amb valor pronòstic: gruix de Breslow, índex de Clark, la ulceració al diagnòstic i l'estadificació TNM.

Taula 15. Característiques clíniques de la cohort prospectiva de l'estudi.

N = 26		N (%)	N (%)	
Sexe			Estat supervivència	
	Home	13 (50%)	Viu	19 (73,1%)
	Dona	6 (23,1%)	N/A	7 (26,9%)
	N/A	7 (26,9%)	Recaiguda / Progressió	
Edat			Si	14 (53,8%)
	< 60	10 (36,5%)	No	9 (34,6%)
	> 60	9 (34,6%)	N/A	3 (11,5%)
	N/A	7 (26,9%)	Tractament	
Breslow (mm)			<u>Cohort BRAF+MEKi:</u>	4 (14,8%)
	1 - 4	6 (23,1%)	<u>Cohort immunoteràpia:</u>	22 (81,5%)
	>4	11 (42,3%)	Tractament adjuvant	14 (63,6%)
	N/A	9 (34,6%)	Tractament pal·liatiu	8 (36,4%)
Índex de Clark			Resposta	
	II	1 (3,8%)	<u>Cohort BRAF+MEKi:</u>	N = 4
	III	3 (11,5%)	RP	1 (25%)
	IV	11 (42,3%)	NR	3 (75%)
	V	1 (3,8%)	<u>Cohort immunoteràpia Adjuvant:</u>	N = 14
	N/A	10 (38,5%)	Recaiguda	8 (57,1%)
Ulceració			No Recaiguda	6 (42,9%)
	Si	12 (46,2%)	<u>Cohort immunoteràpia Pal·liativa:</u>	N = 8
	No	5 (19,2%)	Benefici clínic / No PE	2 (25%)
	N/A	9 (34,6%)	No Benefici clínic / PE	5 (62,5%)
Estadi			N/A	1 (12,5%)
	IIC	2 (7,7%)		
	III	15 (57,7%)		
	IV	8 (30,8%)		
	N/A	1 (3,8%)		

RC = Resposta Completa; RP = Resposta Parcial; NR = No Resposta; PE = Progressió
TLP = Temps lliure de progressió; SLR = Supervivència lliure de recaiguda; N/A = no aplicable

3.2. Validació tècnica de l'anàlisi de biomarcadors per una tècnica d'anàlisi d'expressió alternativa: Nanostring vs RT-qPCR

Per tal de validar la reproductibilitat dels nostres resultats, vam utilitzar una tècnica d'anàlisi d'expressió alternativa a Nanostring®, la RT-qPCR, que és més directa i més cost-efectiva en l'entorn clínic. Amb aquesta tècnica, vam analitzar els 3 biomarcadors en la mateixa cohort retrospectiva. L'expressió de *CXCL8* i *CCL21* es van avaluar per RT-qPCR en 16 de les 27 mostres, ja que el material de les mostres que es van descartar no tenia prou qualitat. En el cas del gen *GHR*, aquest no es va poder analitzar

ja que els nivells d'expressió d'aquest gen eren en general baixos i no quedava material de prou qualitat per a la detecció, per esgotament de la mostra. Seguidament, es va calcular la correlació de Spearman per avaluar si es correlacionaven els resultats obtinguts en el Nanostring® i els obtinguts a partir de la RT-qPCR (**Figura 29**). Segons els resultats obtinguts, podem determinar que les dues tècniques es correlacionen en l'expressió dels gens *CXCL8* i *CCL21* i, per tant, són equivalents. Així doncs, aquesta validació tècnica positiva permetrà utilitzar la tècnica de RT-qPCR per avaluar l'expressió dels biomarcadors en la cohort prospectiva de validació.

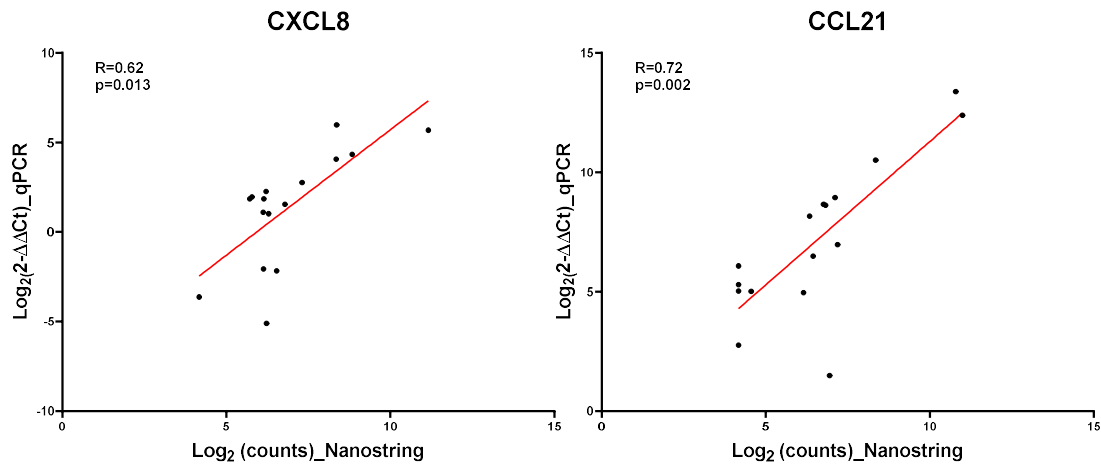


Figura 29. Correlació de Spearman dels resultats d'expressió obtinguts per a la mateixa mostra, mitjançant tecnologia Nanostring® vs RT-qPCR. Pels biomarcadors *CXCL8* i *CCL21* la correlació es representa per una recta, indicant el coeficient de correlació (R) i el p-valor, considerant un p-valor inferior a 0,05 com a estadísticament significatiu.

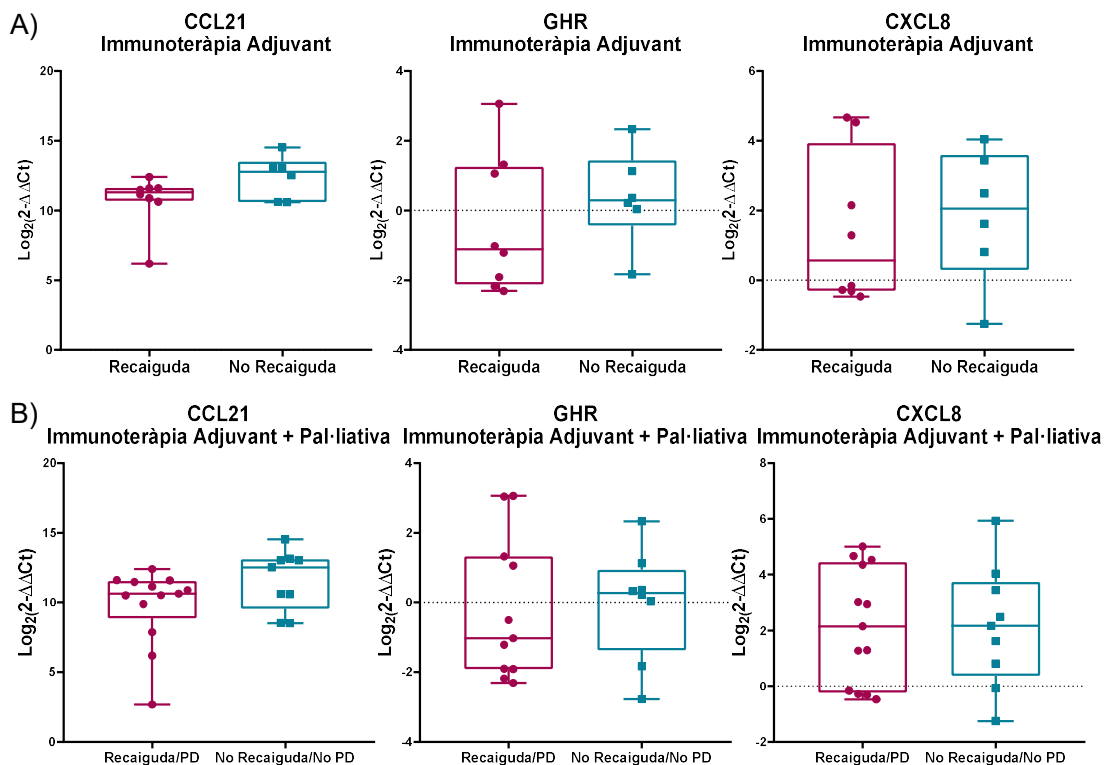
3.3. *CCL21*, *GHR* i *CXCL8* en la cohort prospectiva

Després de la correlació tècnica entre ambdós mètodes d'anàlisi, l'expressió de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8* es va analitzar mitjançant RT-qPCR en la cohort de validació. Degut, en gran part, a que els protocols clínics han canviat al llarg del transcurs d'aquest projecte, amb l'aprovació de la immunoteràpia adjuvant en estadis localment avançats de la malaltia, la majoria de pacients reclutats prospectivament eren tractats en aquest règim de teràpia. De fet, en el règim de tractament de malaltia metastàtica, la poca N aconseguida, no va permetre fer una anàlisi de validació de biomarcadors en els pacients tractats amb teràpia dirigida, ja que només es comptava amb 4 casos, dels que tinguéssim teixit tumoral previ al tractament. Pel que fa a la immunoteràpia, es van aconseguir 8 casos que no van poder ser analitzats de forma independent als casos tractats amb teràpia adjuvant.

Per aquests motius, focalitzats en la falta de casos només tractats en el context metastàtic, vam decidir realitzar una anàlisi exploratòria en el règim adjuvant (N=14) per determinar si l'expressió de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8*, identificats en la cohort retrospectiva,

també podien postular-se com a biomarcadors d'eficàcia en el context de la immunoteràpia adjuvant (**Figura 30**).

En l'escenari de la teràpia adjuvant, *GHR* i especialment *CCL21*, van mostrar la mateixa tendència que l'observada anteriorment en l'anàlisi de la cohort retrospectiva, en el context de la immunoteràpia en règim pal·liatiu: els pacients que no havien recaigut eren els que presentaven una elevada expressió gènica en ambdós casos. Especialment, aquesta associació s'observava en *CCL21* que mostrava unes diferències destacables, encara que no assolien la significació estadística (**Figura 30A**). Aquesta tendència es mantenia a l'afegir els 8 casos tractats amb immunoteràpia en règim pal·liatiu (N=22), fet que postula *CCL21* com un biomarcador d'eficàcia per a la immunoteràpia en ambdós escenaris clínics, en el context adjuvant i en la malaltia metastàtica (**Figura 30B**). Pel que fa a l'expressió de *CXCL8*, aquesta no es va associar amb eficàcia a la immunoteràpia adjuvant. No obstant, s'observava una lleugera tendència, en la mateixa línia que en la cohort retrospectiva, si es tenien en compte només els 8 casos que van rebre immunoteràpia en règim pal·liatiu. Aquests resultats, però, no eren prou rellevants per treure conclusions del seu poder com a biomarcador en aquest context (dades no mostrades).



3.3.1. Impacte de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8* en la supervivència

A continuació, es va estudiar el valor predictiu d'aquests biomarcadors a través del seu impacte en la SLR en la cohort de tractament d'immunoteràpia adjuvant, així com en la SLR i el TLP, quan s'estudiaven en conjunt la cohort adjuvant i la pal·liativa. En línia amb els resultats mostrats anteriorment, la baixa expressió de *CCL21* es va correlacionar de manera significativa amb un TLP més curt en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia adjuvant (**Figura 31A**). De manera similar, en la cohort mixta (adjuvant i pal·liatiu), *CCL21* mostrava la mateixa tendència (**Figura 31B**). Per a *CCL21*, es va calcular el tercil 66 dels valors d'expressió com a punt de tall per estratificar-la com a alta o baixa, basant-nos en la correlació observada entre els casos amb RC al tractament i els nivells més alts d'expressió de *CCL21* en la cohort de descobriment. D'altra banda, l'elevada expressió de *GHR*, estratificada segons la mediana, mostrava una tendència a tenir una SLR més perllongada. Els resultats eren similars al tenir en compte la cohort conjunta, sense arribar a la significació estadística en cap dels dos escenaris (**Figura 31B**). Finalment, no s'observaven diferències quant a supervivència entre els dos grups d'expressió de *CXCL8* en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia adjuvant o adjuvant i pal·liativa, estratificats pel tercil 33. Es va utilitzar aquesta estratificació ja que en la cohort de descobriment tractada amb immunoteràpia els valors més baixos d'expressió eren els que es correlacionaven amb resposta terapèutica.

Tenint en compte els resultats de validació en la cohort prospectiva, el biomarcador més prometedor a ser factor predictiu d'eficàcia terapèutica a la immunoteràpia era *CCL21*, mostrant a més alta expressió una associació significativa amb una millor SLR en la cohort adjuvant. En l'escenari d'aquest subgrup de pacients, es va analitzar si hi havia algun biaix d'alguna variable clinicopatològica pronòstica entre els dos grups de pacients estratificats per l'expressió de *CCL21*. No es van observar diferències significatives entre els dos grups en la majoria de les variables, excepte el sexe, podent assumir que els grups a comparar estaven compensats, pel que fa a factors pronòstic que poguessin afectar els nostres resultats (**Taula 16**).

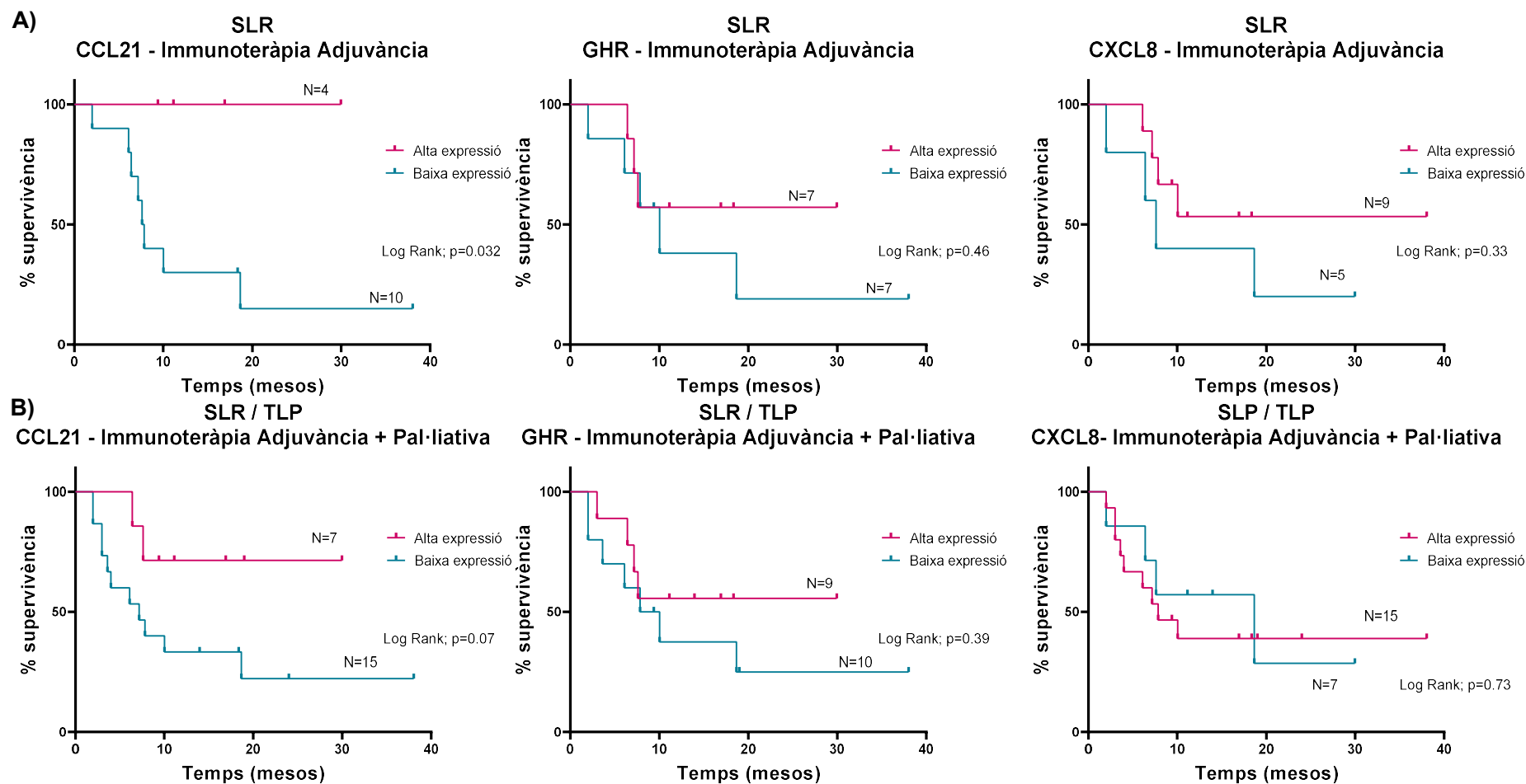


Figura 31. Corbes Kaplan-Meier de la SLP en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia adjuvant **(A)** i la SLP i el TLP en cohort de pacients tractats amb immunoteràpia adjuvant + pal·liativa **(B)**. SLR = supervivència lliure de recaiguda; TLP = temps lliure de progressió.

Taula 16. Taula Txi-Quadrat de la cohort prospectiva de pacients tractada amb immunoteràpia adjuvant.

	N = 14	N (%)	Expressió CCL21 (tercil 66)		p-valor
			Baixa expressió N = 10	Alta expressió N = 4	
Sexe	Home	9 (64,3%)	8 (88,9%)	1 (25%)	0,021
	Dona	4 (28,6%)	1 (11,1%)	3 (75%)	
	N/A	1 (7,1%)			
Edat (anys)	< 60	7 (50%)	5 (55,6%)	2 (50%)	0,853
	> 60	6 (42,9%)	4 (44,4%)	2 (50%)	
	NA	1 (7,1%)			
Breslow (mm)	1 - 4	4 (28,6%)	2 (22,2%)	2 (50%)	0,317
	>4	9 (64,3%)	7 (77,8%)	2 (50%)	
	N/A	1 (7,1%)			
Índex de Clark	II	1 (7,1%)	0 (0%)	1 (25%)	0,292
	III	3 (21,4%)	3 (33,3%)	0 (0%)	
	IV	7 (50%)	4 (44,4%)	3 (75%)	
	V	2 (14,3%)	1 (11,1%)	0 (0%)	
	N/A	1 (7,1%)			
Ulceració	Si	8 (57,1%)	7 (77,8%)	1 (25%)	0,071
	No	5 (35,7%)	2 (22,2%)	3 (75%)	
	N/A	1 (7,1%)			

p-valor de l'anàlisi per test Txi-Quadrat o Fisher; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001
N/A = no aplicable.

Posteriorment, es va realitzar una anàlisi univariada mitjançant un test de regressió de Cox, per tal de determinar si les variables clíniques i histopatològiques de la cohort prospectiva tractada amb immunoteràpia adjuvant, tenien un impacte en la SLR. Es van analitzar les següents variables dicotomitzades: sexe (home/dona), edat (<60 anys/>60 anys), gruix de Breslow (1-4/>4), índex de Clark (<IV/>IV) i ulceració (si/no) i cap d'elles presentava un impacte significatiu en la SLR (dades no mostrades).

RESULTATS ESTUDI II

Estudi de la implicació de biomarcadors no genètics en la resistència adquirida als inhibidors de BRAF+MEK

1. Generació de línies cel·lulars de melanoma cutani amb resistència adquirida a la combinació de dabrafenib + trametinib

Per tal d'obtenir una línia cel·lular resistent a la combinació de dabrafenib + trametinib, es va tractar la línia cel·lular de melanoma cutani IGR37, inicialment sensible a aquests fàrmacs, a dosis creixents de la combinació. En el punt de resistència, la dosi final de la combinació de fàrmacs s'havia multiplicat 64 vegades respecte a la inicial després d'aproximadament 8 mesos. Aquest procés es va dur a terme durant el mateix període de temps en paral·lel en 3 rèpliques experimentals independents. La IC_{50} de la combinació en la línia sensible i les línies derivades resistents, anomenades IGR37-R1, IGR37-R2 i IGR37-R3, es mostra en la **Figura 32**.

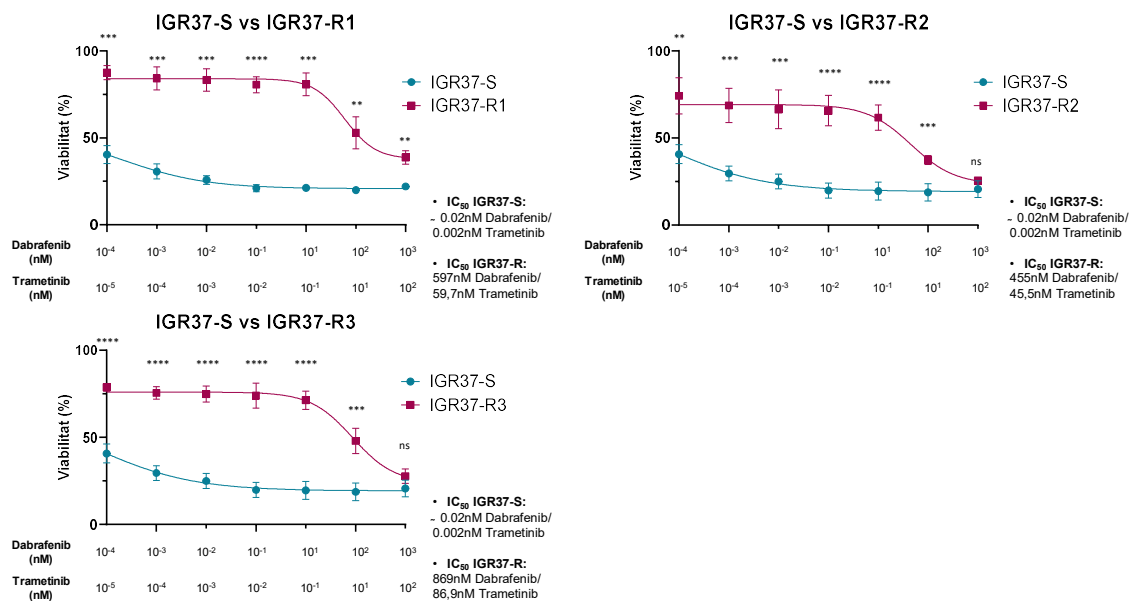


Figura 32. Experiments MTT de les línies IGR37-S vs IGR37-R1, IGR37-R2 i IGR37-R3 sota la combinació dels fàrmacs dabrafenib i trametinib per determinar el grau de resistència. p-valor del test t-student no aparellada; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es considera estadísticament significatiu.

Breument, la IC_{50} de la línia sensible (anomenada IGR37-S) era de 0,02nM per dabrafenib i 0,002nM per trametinib. En les línies resistents la IC_{50} era 597nM per dabrafenib + 59,7nM per trametinib en la línia IGR37-R1, 869nM per dabrafenib + 86,9nM per trametinib en la línia IGR37-R2 i 455nM per dabrafenib + 45,5nM per

trametinib en la línia IGR37-R3. En els tres casos, el nivell de resistència era estadísticament significatiu respecte la línia sensible.

Pel que fa al fenotip, la línia IGR37-S presentava una morfologia diferent a les resistents. Aquestes últimes presentaven una major mida i una forma més allargada, suggerint que podien ser cèl·lules de caràcter més mesenquimal (**Figura 33**).

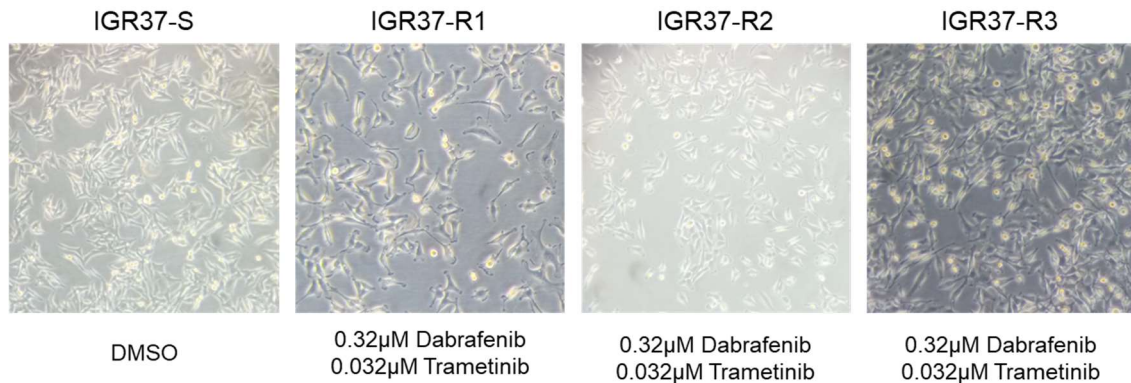


Figura 33. Imatges de microscopi òptic de la morfologia de les línies cel·lulars IGR37-S, IGR37-R1, IGR37-R2 i IGR37-R3. Les línies resistents es mantenen en medi amb la concentració de fàrmacs a la que es va establir el nivell de resistència final (Microscopi òptic; 10X).

2. Anàlisi mitjançant la tècnica de *scRNAseq* de les alteracions transcriptòmiques involucrades en l'adquisició de resistència als inhibidors de BRAF+MEK en el model *in vitro* de resistència adquirida

La tècnica de *scRNAseq* permet estudiar l'expressió gènica de cada cèl·lula individual i permet identificar diferències entre subpoblacions dins la mateixa mostra. Es van comparar els gens diferencialment expressats entre les línies cel·lulars IGR37-S i IGR37-R1. Només es va analitzar la rèplica R1 per aquesta tècnica a causa del seu cost i la complexitat de l'anàlisi de les dades amb la idea de validar els resultats més prometedors a les rèpliques –R2 i –R3, per tècniques directes.

Finalment, es van identificar les diferències en l'expressió gènica entre IGR37-S i la derivada IGR37-R1, així com el percentatge de clons cel·lulars que expressaven cada gen en cada condició (pct). En aquest punt, es van identificar 2876 gens significativament implicats en l'adquisició de resistència en teràpia dirigida (Wilcoxon test; p-valor (ajustat) < 0,01): 1702 amb expressió augmentada i 1174 amb expressió disminuïda en la condició resistent.

3. Anàlisi integral de dades per a dilucidar els mecanismes adaptatius i de plasticitat cel·lular implicats en l'adquisició de resistència a teràpia dirigida i la selecció dels biomarcadors més robustos per a futurs estudis.

3.1. Selecció dels gens candidats associats amb l'adquisició de resistència per l'enriquiment de clons cel·lulars

La tècnica *scRNAseq* permet avaluar no només els canvis en l'expressió (*fold change*) sinó també els canvis en els percentatges de cèl·lules que cada gen concret expressa. Per tant, per a l'anàlisi de les dades derivades es plantejaven dos escenaris possibles per explicar l'expressió diferencial entre el grup de cèl·lules sensibles i les resistents: a) canvis de nivell d'expressió deguts a un enriquiment o empobriment de clons cel·lulars durant el procés d'adquisició de resistència (el número de clons amb aquestes característiques és diferent entre IGR37-S i -R1); b) canvis de nivell d'expressió causats per una desregulació probablement associada a alteracions genètiques o epigenètiques (el nombre de clons amb aquestes característiques és similar entre IGR37-S i -R1).

En el nostre estudi ens vam centrar en l'anàlisi de l'adquisició de resistència deguda a un enriquiment de subpoblacions cel·lulars, ja presents en la sensibilitat, amb unes característiques que resulten ser avantatjoses per a la supervivència cel·lular o bé que mitjançant un canvi de fenotip esdevenen avantatjoses i que s'enriqueixen al llarg del procés de resistència (opció a). En aquesta línia, es van aplicar els criteris de selecció descrits anteriorment en l'apartat 2.3.3 de Metodologia [$\log_2(\text{FC}) > 1,5$ o $< -1,5$; $p\text{-valor} < 0,01$; $\text{pctR}/\text{pctS} > 2$ per gens sobreexpressats en resistència i $\text{pctS}/\text{pctR} > 2$ en els infraexpressats] i es van identificar 88 gens amb expressió augmentada (**Taula suplementària 3**) i 23 gens amb expressió disminuïda (**Taula suplementària 4**) al comparar la condició resistent vs la sensible.

3.2. Anàlisi d'Ontologia Gènica (GO) dels gens seleccionats

A partir dels llistats de gens seleccionats (apartat 3.1) i amb l'objectiu d'identificar en quins processos estaven involucrats, es va realitzar una anàlisi d'Ontologia Gènica (GO) a través de la generació de clústers mitjançant l'eina *DAVID functional annotation chart*. Els 88 gens amb expressió enriquida en la línia cel·lular resistent estaven principalment implicats en mecanismes d'adhesió i migració cel·lular, així com en la regulació del creixement cel·lular (**Figura 34A**). D'altra banda, els 23 gens amb expressió disminuïda en els clons cel·lulars de la línia resistent, estaven principalment implicats en el procés de biosíntesi de la melanina (*DCT*, *MFSD12*, *TYRP1*, *TYR*) i diferenciació dels melanòcits (*MLANA*, *S100*, *SOX10*, *MITF*, *PMEL*) (**Figura 34B**). Això suggereix que

l'adquisició de resistència en el nostre model *in vitro* està associada a un procés de desdiferenciació de les cèl·lules tumorals de melanoma.

3.3. Anàlisi de GSEA de signatures de plasticitat fenotípica

A partir de l'observació d'una pèrdua de clons cel·lulars amb expressió de gens de diferenciació propis del melanoma, es va assumir una desdiferenciació cel·lular associada amb el procés d'adquisició de resistència. Aquesta hipòtesi portava a pensar en canvis de fenotips cel·lulars al llarg del procés. Amb aquesta premissa, es va fer una anàlisi de GSEA comparant els gens diferencialment expressats en IGR37-S vs -R1 amb 7 signatures d'expressió gènica associades a diferents fenotips cel·lulars. Aquestes estan caracteritzades a la bibliografia (**Taula 5**, Introducció) i associades amb diferents nivells de resistència/sensibilitat a teràpia dirigida en melanoma. Tenint en compte el NES (*normalized enrichment score*) i el p-valor ajustat (**Figura 35**), entre les cèl·lules sensibles hi havia un enriquiment de les vies relacionades amb un fenotip "proliferatiu" (*Hoek et al. (239), Verfaillie et al. (240)*), associat a MITF (*Tirosh et al. (229)*), "melanocític" (*Tsoi et al. (230)* i *Wouters et al. (231)*) i "híperactivat" (*Rambow et al. (233)*). D'altra banda, les cèl·lules resistents mostraven un enriquiment en els fenotips "invasius" (*Hoek et al. (239), Verfaillie et al. (240)* i *Rambow et al. (233)*), associats a AXL (*Tirosh et al. (229)*), "desdiferenciat" (*Tsoi et al. (230)*) i de tipus "mesenquimal" (*Wouters et al. (231)*). També s'observa un enriquiment moderat de clons cel·lulars amb fenotip "intermedi" tipus "cresta neural" (NCSC) (*Rambow et al. (233)*), propis de fases intermèdies descrites en el procés d'adquisició de resistència (**Figura 35**).

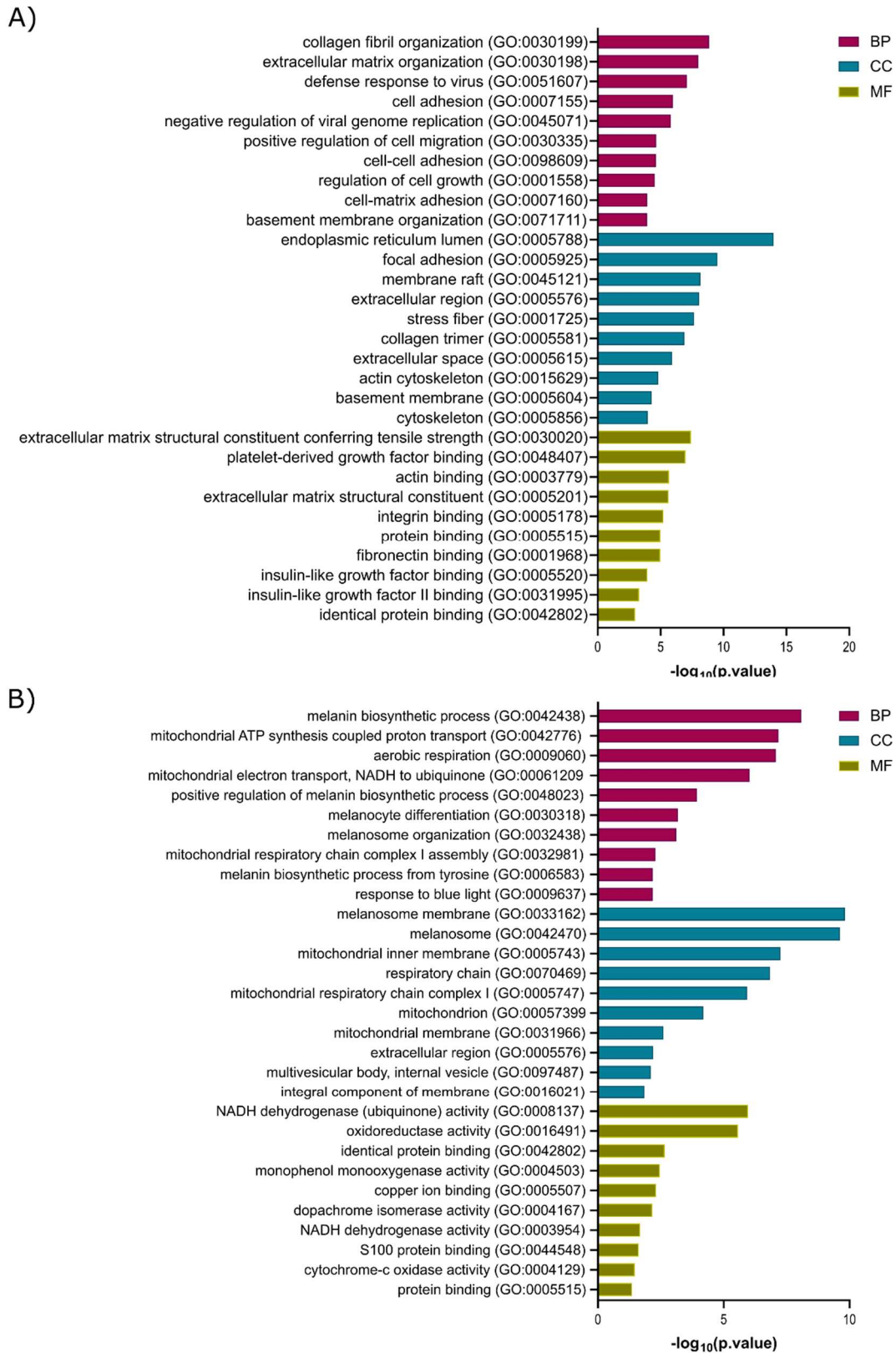


Figura 34. Anàlisi d'Ontologia Gènica (GO) dels gens seleccionats utilitzant l'eina *DAVID funcional annotation chart*. Clúster representatiu dels 88 gens amb expressió enriquida (**A**) i dels 23 gens amb expressió disminuïda (**B**) en els clons cel·lulars resistents vs els sensibles. Es van extreure els termes GO corresponents a processos biològics (BP) (GOTERM_BP_DIRECT), component cel·lular (CC) (GOTERM_CC_DIRECT) i funció molecular (MF) (GOTERM_MF_DIRECT) i s'han representat les 10 vies amb millor p-valor amb el $-\log_{10}(p\text{-valor})$ de cada subgrup.

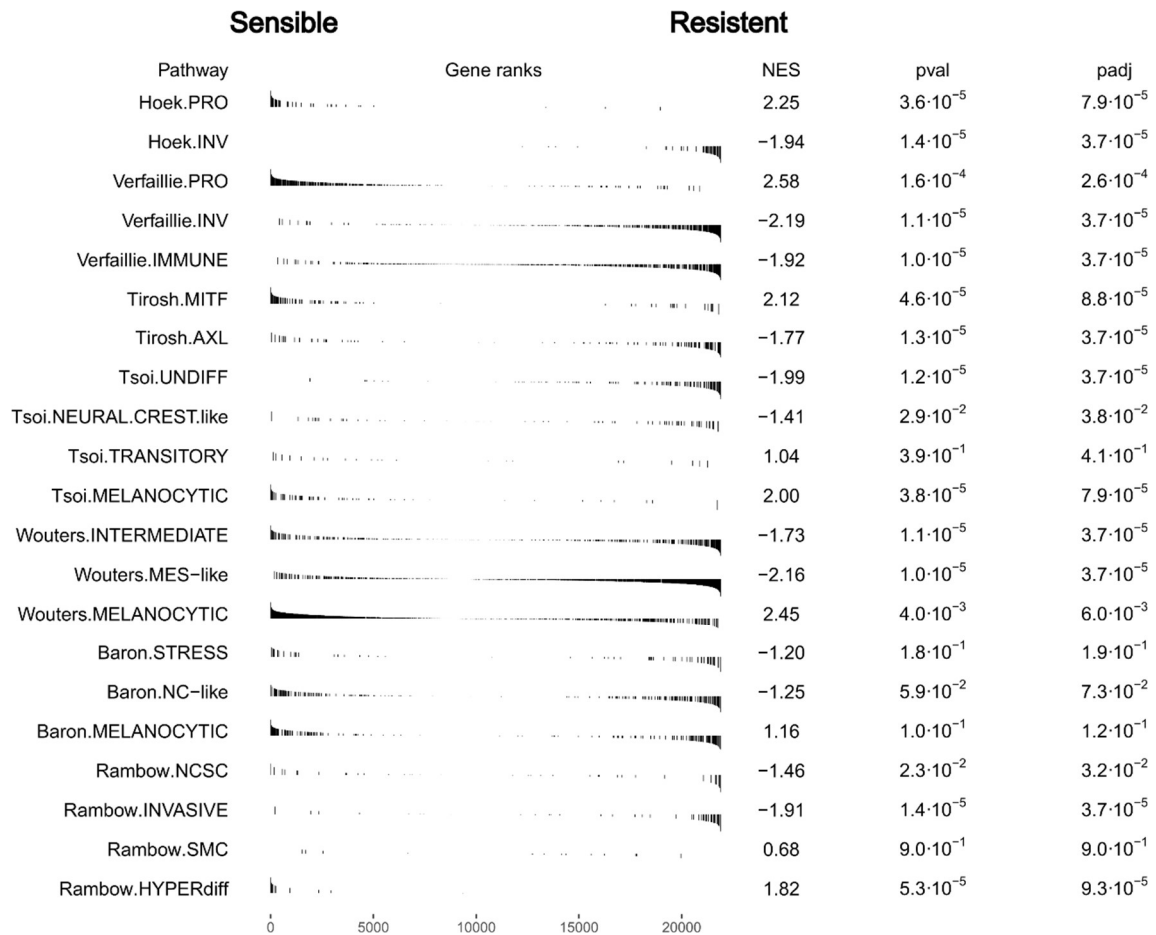


Figura 35. Taula amb els resultats del GSEA de les signatures descrites a la bibliografia. A la figura: “pathway” és el nom de la signatura, “padj” és el p-valor ajustat pel mètode de Benjamini-Hochberg per a comparacions múltiples i “NES” és el *normalized enrichment score* per la mitjana de mostres aleatòries de la mateixa mida.

A més a més de l’anàlisi de GSEA, es va realitzar un *scoring* d’aquestes signatures i es van representar les projeccions UMAP per tal de visualitzar l’expressió de cada signatura en el conjunt de cèl·lules sensibles i resistent. Els resultats van corroborar que les cèl·lules sensibles expressaven, en major nombre de cèl·lules i en major nivell, signatures relacionades amb el fenotip més proliferatiu, melanocític i diferenciat. En canvi, les cèl·lules resistent expressaven signatures associades a un fenotip de tipus invasiu, desdiferenciat i mesenquimal (**Figura 36** i **Figura suplementària 5**). En aquestes últimes, també es va observar, de nou, un lleuger enriquiment de fenotips definits com a intermedis, com el de cresta neural.

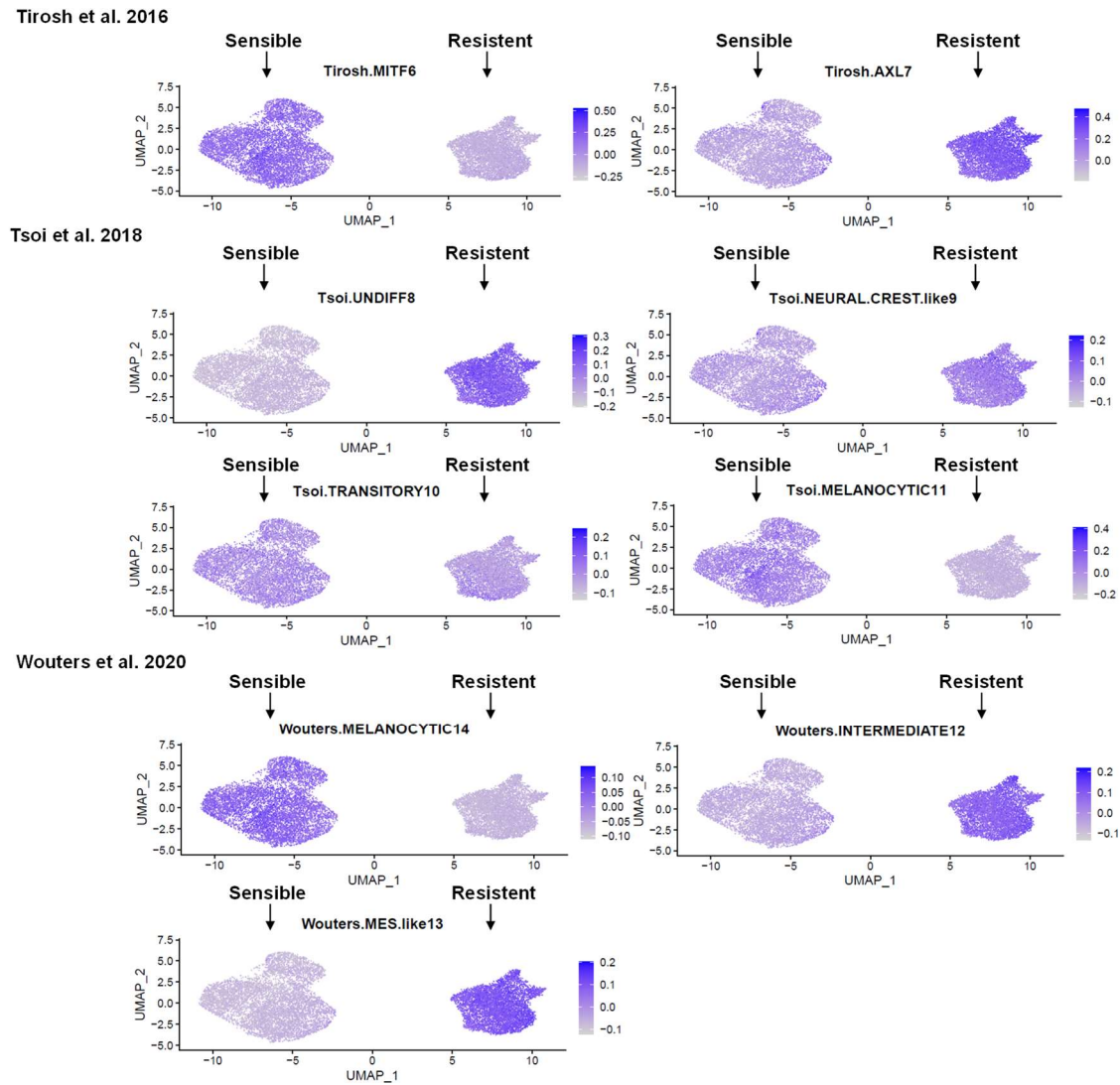


Figura 36. Projeccions UMAP per representar el *scoring* de les signatures en la població de cèl·lules sensibles i en la línia resistent. El *scoring* es va realitzar utilitzant la funció *AddModuleScore()* de l'entorn Seurat: les cèl·lules sensibles expressaven signatures relacionades amb el fenotip proliferatiu (Tirosh.MITF6), diferenciat i melanocític (Tsoi.MELANOCYTIC11); les cèl·lules resistents expressaven signatures associades a un fenotip de tipus invasiu (Tirosh.AXL7), desdiferenciat (Tsoi.UNDIFF8) i mesenquimal (Wouters.MES.like13). El grau d'expressió es representa per intensitat de color, correlacionant el grau més fosc amb major expressió. En el núvol de punts, cadascun representa un clon cel·lular.

L'expressió dels gens més representatius de cada signatura, associats a cada fenotip cel·lular, es van estudiar en cada condició mitjançant la representació per UMAP. En el cas del fenotip proliferatiu es destaquen els marcadors: *MITF*, *MLANA*, *S100B* i *SOX10*. En línia amb les troballes anteriors, es va observar que aquests estaven més representats, tant en expressió com en percentatge de cèl·lules, en els clons cel·lulars de la línia sensible. Paral·lelament, pel fenotip mesenquimal o desdiferenciat es van analitzar els marcadors *SOX9* i *AXL*. L'expressió d'*AXL* estava fortament enriquida en les cèl·lules resistents. En el cas de *SOX9*, el nombre de clons cel·lulars que

l'expressaven va ser reduït però, tot i així, superior en la línia resistent respecte els clons sensibles (**Figura 37**).

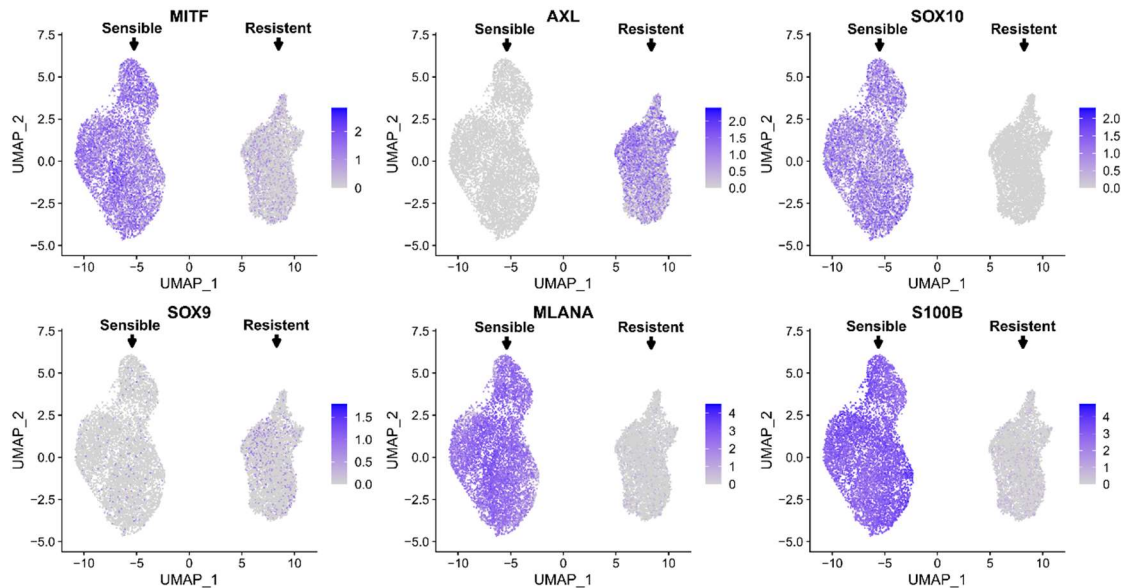


Figura 37. Representació UMAP del *scoring* dels marcadors més representatius de fenotip proliferatiu (*MITF*, *SOX10*, *MLANA* i *S100B*) i de fenotip mesenquimal/desdiferenciat (*AXL* i *SOX9*), en la població de cèl·lules sensibles i en les resistents. El *scoring* s'ha realitzat utilitzant la funció *AddModuleScore()* de l'entorn Seurat. El grau d'expressió es representa per intensitat de color, correlacionant el grau més fosc amb major expressió. En el núvol de punts, cadascun representa un clon cel·lular.

Finalment, es va analitzar la presència de fenotips intermedis: SMC (fenotip de transició cap a la resistència o desdiferenciació) mitjançant l'expressió de *CD36*, que es detectava en un reduït grup de clons cel·lulars en la línia resistent; fenotip tipus "cresta neural", a través de *NGFR*, *AQP1* i *GFRA2*, que no mostraven expressió ni en les cèl·lules sensibles ni les resistents, fet que indica que els seus clons cel·lulars no es troben en aquest estat fenotípic, més característic de la fase de tolerància (**Figura suplementària 6**).

4. Identificació d'un biomarcador implicat en l'adquisició de resistència i validació de la seva funció

4.1. Criteris de selecció del candidat més prometedori: SPOCK1

La caracterització dels fenotips cel·lulars descrits en la bibliografia en el nostre model de resistència *in vitro* dona robustesa a la hipòtesi que l'adquisició de resistència pot ser deguda a un canvi de fenotip de les cèl·lules cap a un fenotip més mesenquimal. Això no obstant, l'objectiu del nostre projecte era identificar biomarcadors involucrats en el procés d'adquisició de resistència i validar la seva funció en aquest procés. Així mateix,

el fet d'identificar biomarcadors de resistència en el grup de gens amb expressió augmentada en les cèl·lules resistents permet estudiar la seva potencial funció com a diana terapèutica. El flux de treball pel qual es van analitzar totes les dades procedents de l'anàlisi per la tècnica *scRNAseq* queda resumit a la **Figura 38**.

Per tant, de la llista dels 88 gens candidats a marcadors de resistència descrits anteriorment, es va fer una cerca bibliogràfica aplicant els següents criteris de selecció: a) que en la bibliografia s'hagués descrit la implicació del gen en el desenvolupament d'altres càncers; b) que tingués implicació en algun procés de canvi de fenotip i c) es va valorar que tingués algun rol en la via de les MAPK. Finalment, es va seleccionar el gen *SPARC/osteonectin cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1* (*SPOCK1*) com a candidat per a l'estudi, ja que complia tots aquests requisits. El gen *SPOCK1* ha estat associat a un pitjor pronòstic en el carcinoma de cèl·lules renals, càncer d'ovari i adenocarcinoma de pulmó (280–282), també ha estat involucrat en la progressió del càncer de mama i del carcinoma hepatocel·lular (283,284) i en la proliferació, migració i invasió del càncer de pròstata, del càncer gàstric i del càncer de colon (285,286,286). A més a més, està implicat en el procés de transició epitel·li mesènquima (EMT) (281,285,287–290).

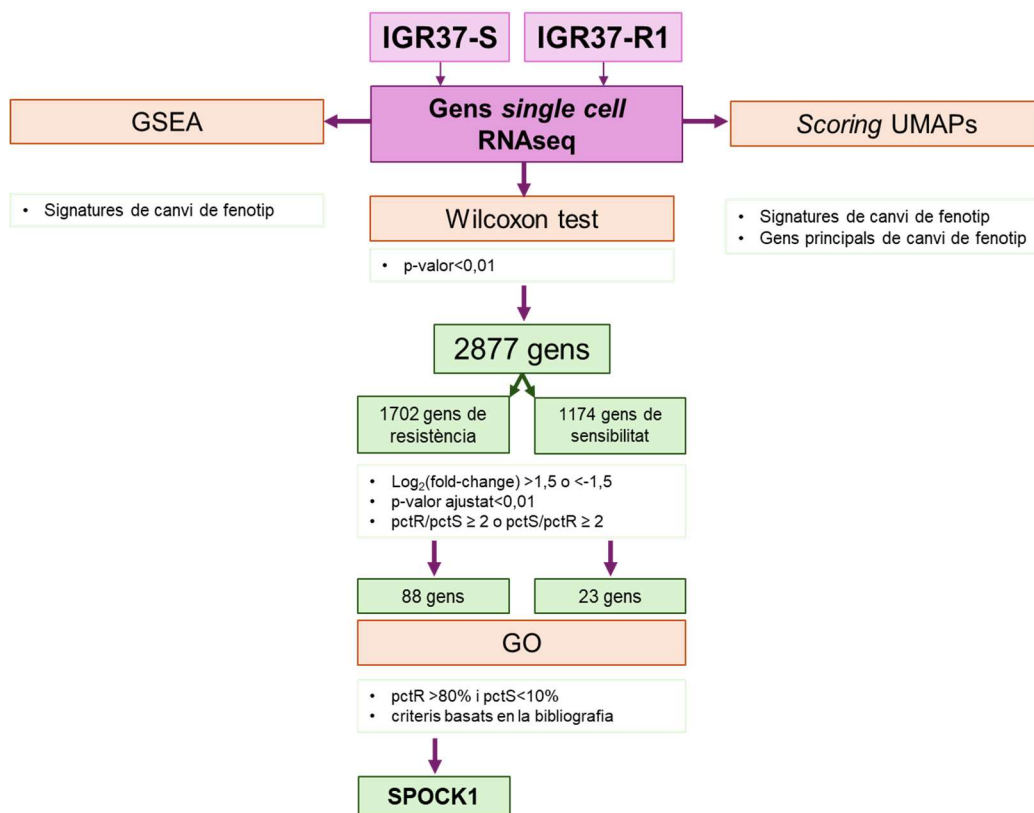


Figura 38. Esquema del flux de treball realitzat per les anàlisis de les dades procedents de la tècnica *scRNAseq*.

4.2. Anàlisi de l'associació de l'expressió de *SPOCK1* amb els fenotips de plasticitat cel·lular implicats en l'adquisició de resistència en el nostre model

El gen *SPOCK1*, sobreexpressat en la condició de resistència vs la sensible [$\log_2(\text{fold change}) = -1,78$], s'expressava en el 85% dels clons cel·lulars resistents davant només el 5% de les cèl·lules sensibles (**Figura 39A**).

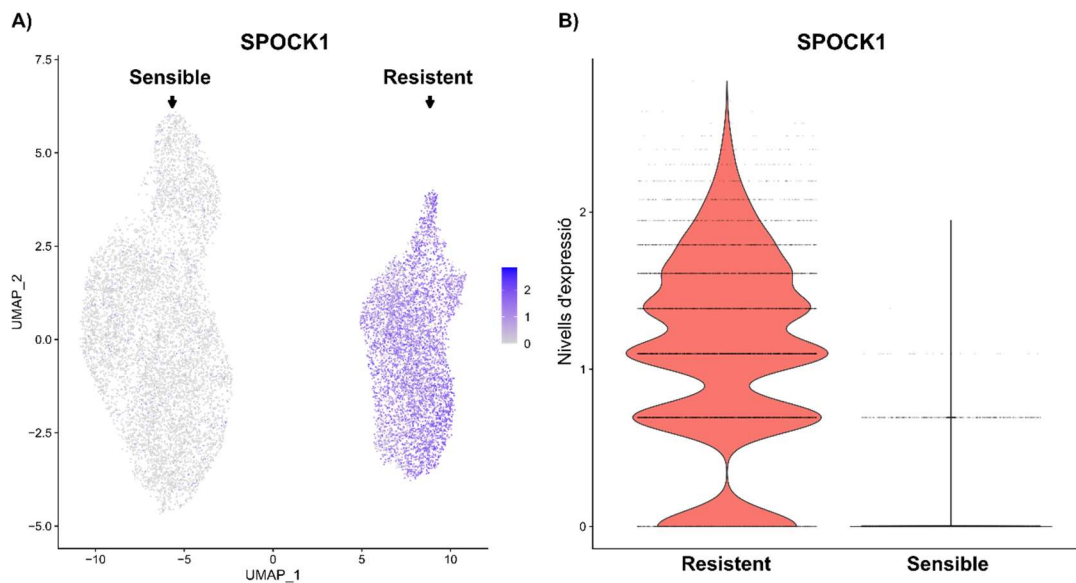


Figura 39. Expressió de *SPOCK1* en els clons cel·lulars sensibles i resistents. **A)** Representació per UMAP del *scoring* d'expressió del gen *SPOCK1*. El grau d'expressió es representa per intensitat de color, correlacionant el grau més fosc amb major expressió. En el núvol de punts, cadascun representa un clon cel·lular. En cap d'ambdues condicions *SPOCK1* s'expressa en clústers de clons cel·lulars. **B)** Nivells d'expressió del gen *SPOCK1* en el grup de cèl·lules resistents i sensibles, valorat en cada clon cel·lular de manera individual.

Llavors, es va estudiar si cada clon cel·lular *SPOCK1*⁺ tenia nivells d'expressió del gen diferents segons si es trobaven en la línia sensible o la resistent (**Figura 39B**) i si el que feia augmentar l'expressió del gen era l'increment del nombre de clons positius. Encara que una part de clons *SPOCK1*⁺ en la resistència presentaven una sobrerregulació de l'expressió d'aquest, un important percentatge tenien nivells d'expressió del gen similars als dels clons *SPOCK1*⁺ de la condició sensible. Amb aquests resultats preliminars, podem hipotetitzar que els canvis en l'expressió de *SPOCK1* entre cèl·lules sensibles i resistents són deguts a un augment de cèl·lules que expressen aquest gen en el grup de les resistents, juntament amb alteracions de regulació gènica, potencialment adquirides. Posteriorment, es va avaluar si les cèl·lules *SPOCK1*⁺ del grup de les sensibles tenien característiques similars a les *SPOCK1*⁺ resistents mitjançant una anàlisi GSEA. En les primeres, es va observar que les signatures "Wouters.MES-like" i "Tirosh.AXL" estaven també significativament enriquides (**Figura suplementària 7**).

Paral·lelament, per estimar si els clons cel·lulars *SPOCK1*⁺ de la línia resistent coincidien en tenir un fenotip mesenquimal, es va correlacionar la seva expressió amb els gens *AXL* i *SOX9* i amb una signatura de fenotip mesenquimal i es va demostrar que coexpressaven en els mateixos clons de forma significativa (**Figura suplementària 8A**). Contràriament, l'expressió de *SPOCK1* no es correlacionava amb l'expressió de *MITF*, *MLANA* i *SOX10* (**Figura suplementària 8B**).

4.3. Validació *in silico* de l'expressió de *SPOCK1* en altres models cel·lulars de resistència a inhibidors de BRAF+MEK

Addicionalment a la validació del rol de *SPOCK1* en les línies cel·lulars IGR37-S i -R, es va estudiar l'expressió d'aquest gen *in silico* en altres línies cel·lulars de melanoma cutani. En primer lloc, vam fer una anàlisi *in silico* utilitzant les eines facilitades per (231). En aquest treball, per tal d'estudiar els diferents estats del melanoma, realitzen una anàlisi mitjançant la tècnica *scRNAseq* de 9 cultius cel·lulars derivats de teixit de pacients, les línies MM (240) i la línia cel·lular A375, i classifiquen aquests cultius segons el seu fenotip cel·lular. Hi havia 7 cultius que expressaven *SOX10* i *MITF*: MM01, MM011, MM031, MM057, MM074, MM087 i A375. La resta de cultius, MM029, MM047 i MM099, expressaven *SOX9*, marcador de les cèl·lules de melanoma que han fet un canvi fenotípic cap a un estat desdiferenciat, tipus mesenquimal i resistent a teràpia. Mitjançant l'eina *SCope*, desenvolupada al *Aerts Lab* (291) i que permet visualitzar *in silico* bases de dades de *scRNAseq*, vam interrogar l'expressió de *SPOCK1* usant les dades de *Wouters et al.* en els clons cel·lulars de cada un dels 10 cultius de melanoma descrits anteriorment. De manera interessant, els tres cultius classificats com a més desdiferenciats coexpressaven *SPOCK1*, a diferència dels cultius que expressaven *MITF* i *SOX10* (**Figura 40A-B**). A més a més, es va realitzar un *heatmap* a partir de les dades d'expressió conjuntes o *bulkRNAseq* per cada línia cel·lular (GSE134432) i es va estudiar com es relacionava l'expressió de *SPOCK1* amb la resta de gens característics de cada fenotip. Es van utilitzar les dades d'expressió dels gens *PMEL*, *MITF*, *MLANA* i *SOX10*, l'expressió dels quals està associada a fenotips més melanocítics i proliferatius, així com l'expressió de *AXL*, *SOX9*, associada a fenotips més invasius, i dels gens *AQP1*, *S100B*, *NGFR* i *CD36*, relacionats amb fenotips intermedis. Les línies cel·lulars es van ordenar a partir de l'expressió de *MITF* i es va realitzar un *heatmap* per tal de clusteritzar els gens de manera no supervisada. Es va observar que el gen *SPOCK1* clusteritzava de manera similar a *AXL* i *SOX9*, associats al fenotip invasiu i mesenquimal. D'altra banda, *MITF*, *MLANA* i *PMEL* s'expressaven conjuntament en les cèl·lules associades a fenotips més proliferatius o intermedis (**Figura 40B**).

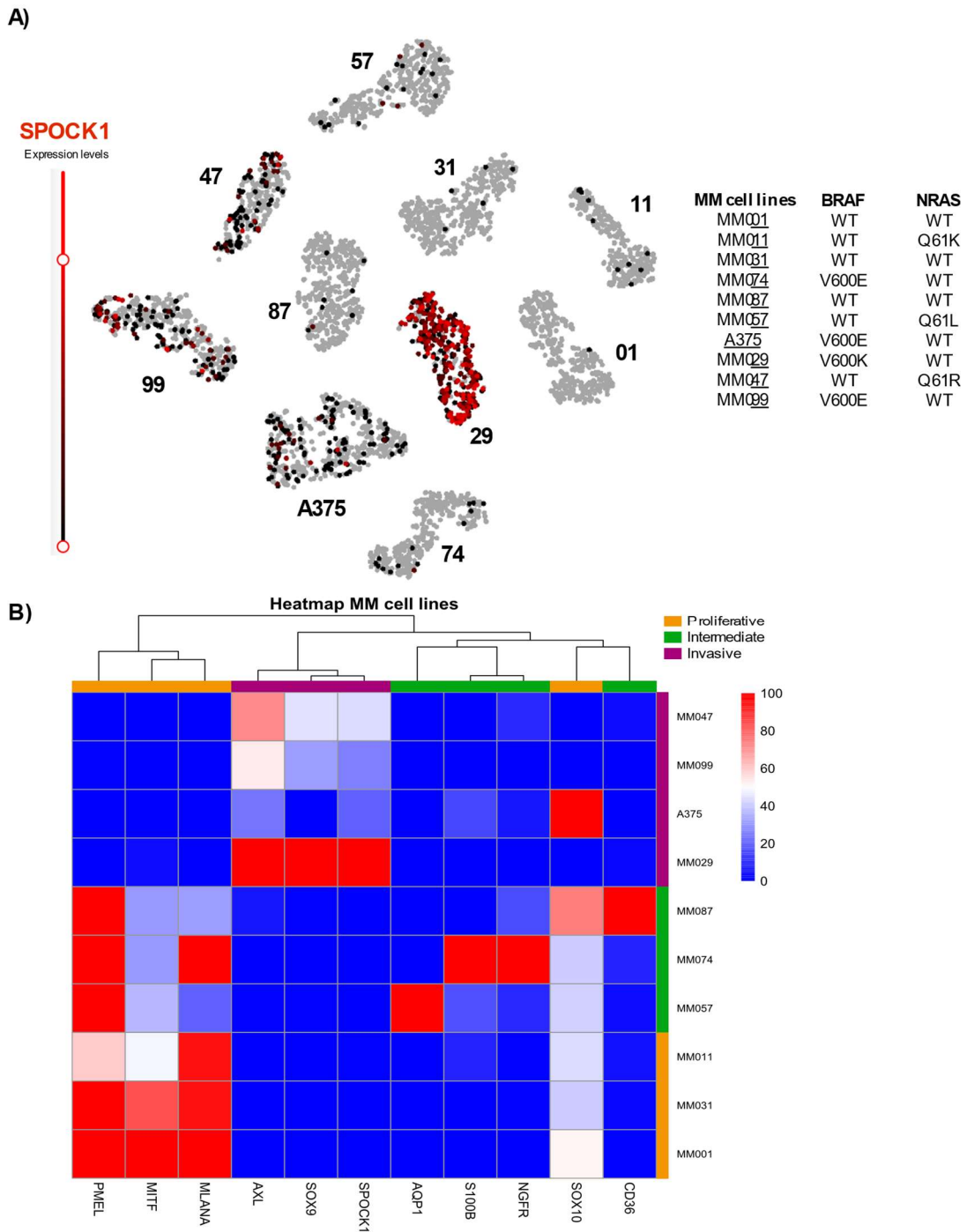


Figura 40. Expressió del gen *SPOCK1* en les línies cel·lulars de melanoma derivades de teixit de pacients. **A)** Representació de l'expressió de *SPOCK1* en la visualització per t-SNE de clons cel·lulars per a cada línia cel·lular ("MM cell lines"), realitzat a partir de l'eina *in silico* SCOPE. A la figura també es representen l'estatus mutacional de *BRAF* i *NRAS*, essent "wt" l'absència de la mutació. L'expressió del gen es representa per gradació de colors, essent la màxima expressió representada en vermell, la intermèdia en negre fins a la mínima, en gris. **B)** *Heatmap* de les línies cel·lulars (eix coordenades) a partir de les dades d'expressió de *bulkRNAseq*, ordenades pel nivell d'expressió del gen *MITF* (de menor a major), i classificant-se com a invasives (lila; N = 4), intermèdies (verd; N = 3) i proliferatives (groc; N = 3). La clusterització de l'expressió dels gens seleccionats (eix ordenades) s'ha fet de forma no supervisada, utilitzant l'entorn R. Els nivells d'expressió es representen per gradació de colors, essent la màxima expressió representada en vermell, i la mínima en blau fosc.

D'altra banda, es van utilitzar les dades d'expressió provinents del *bulkRNAseq* efectuat al treball de (260) (GSE75299). En aquest estudi, van estudiar l'efecte dels inhibidors de BRAF i MEK en línies cel·lulars de melanoma amb el gen *BRAF*^{V600E} mutat que eren prèviament sensibles. Per tal de determinar els diferents estats transcripcionals dinàmics que ocorren al llarg del tractament van establir diferents punts temporals de tractament. En el primer punt es van establir les cèl·lules parentals (P) que eren tractades amb DMSO. En segon lloc, es van determinar les subpoblacions temporals tractades amb inhibidors de BRAF: les cèl·lules tractades durant dos dies (BRAFiD2), les cèl·lules tractades durant diversos dies, anomenades com DTPs (*Drug-Tolerant Persisters*) i les tractades durant setmanes, caracteritzades com les DTPPs (*Drug-Tolerant Proliferating Persisters*). Finalment, també es van establir les línies a llarg termini tractades durant mesos o anys amb inhibidors de BRAF o inhibidors de BRAF+MEK: les línies SDR (*single drug resistant*) i les DDR (*double drug resistant*), respectivament (**Figura 41**).

A partir de les dades transcripcionals de tots aquests estats, derivats de l'anàlisi de les línies cel·lulars de melanoma M238 (**Figura 41A**), M229 (**Figura 41B**) i SKMEL-28 (**Figura 41C**), es va interrogar l'expressió del gen *SPOCK1*, l'expressió de gens característics del fenotip melanocític *PMEL*, *MITF* i *MLANA* i dels característics del fenotip mesenquimal *AXL* i *SOX9*. Les dades d'expressió d'aquests, en els diferents estats cel·lulars, es va relativitzar a les de l'estat parental (P) i es va representar la ràtio com a $\log_2(\text{fold change})$. Les dades d'expressió estaven normalitzades a FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*). L'expressió de *SPOCK1* augmentava al llarg del tractament, en els diferents estats cel·lulars (**Figura 41A-C**). De manera curiosa, en el cas de les línies cel·lulars M229 (**Figura 41B**) i SKMEL28 (**Figura 41C**) hi havia més expressió de *SPOCK1* en les cèl·lules tractades només amb inhibidors de BRAF (SDR) respecte les tractades amb la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK (DDR). L'expressió de *PMEL* i *MLANA* (gens de diferenciació) disminuïa al llarg dels estats cel·lulars sota el tractament, mentre *SOX9* i *AXL* (fenotip invasiu) augmentava. Curiosament, en les línies M238, hi ha un increment significatiu de l'expressió de *SOX9*, que es produeix entre l'estat cel·lular de pocs dies i poques setmanes de tractament, però no existeix una variació evident dels gens de diferenciació, ni per contra, del gen *AXL* (**Figura 41A**). Pel que fa a *MITF*, s'observa una disminució sota pressió terapèutica en SKMEL28, en canvi en les línies M238 i M229, l'expressió de *MITF* disminuïa en els tractaments més curts i després tornava a augmentar en els estats a llarg termini, essent però, en tots els casos, inferior a les parentals.

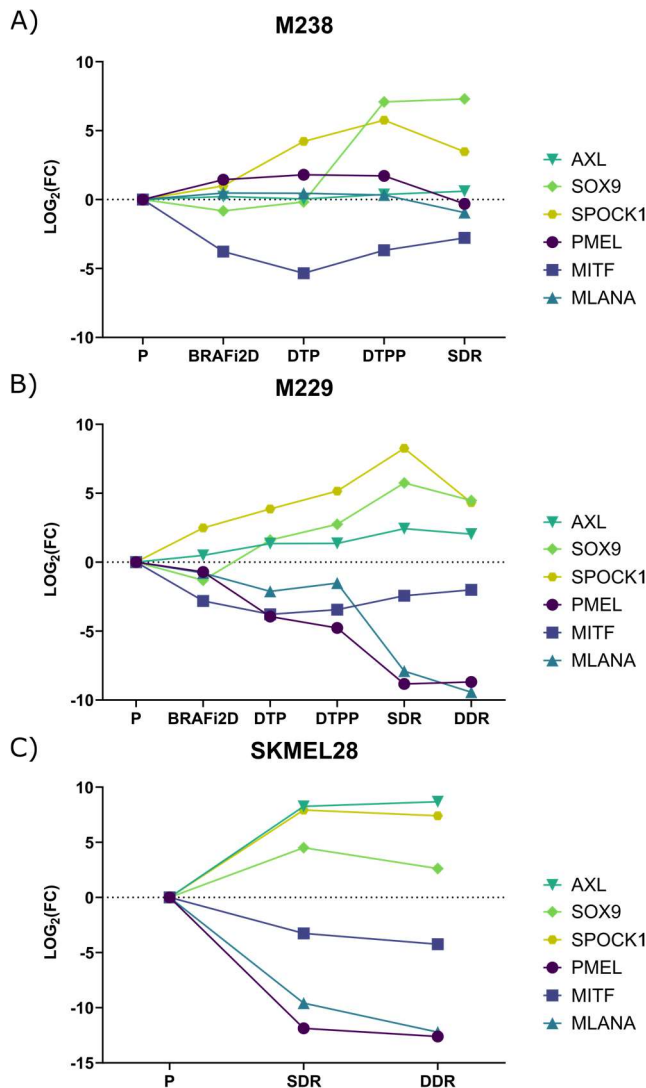


Figura 41. Expressió del gen *SPOCK1* i gens propis de fenotips cel·lulars proliferatius (PMEL, MITF, MLANA) i invasius (AXL, SOX9) en els diferents estats cel·lulars de les línies de melanoma M238 (A), M229 (B) i SKMEL-28 (C), generats en diferents fases de tractament (tt) amb inhibidors de BRAF (eix ordenades): P = Parental; BRAFi2d = 2 dies de tt; DTPs = diversos dies de tt; DTPPs = mesos de tt; SDR = tt a llarg termini amb BRAFi; DDR = tt a llarg termini amb BRAFi combinats amb MEKi. Dades d'expressió procedents de (260) (GSE75299). En els gràfics es representa el \log_2 del *fold change* de l'expressió gènica en cada estat cel·lular de tractament, relatiu a l'estat parental per a cada línia cel·lular: la sobreexpressió es representa amb valors positius i el decrement amb valors negatius (eix coordenades).

4.4. Validació *in silico* de l'expressió de *SPOCK1* en cohorts de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK

Finalment, es van analitzar les dades d'expressió gènica publicades a la bibliografia en cohorts de pacients de melanoma per tal de validar si l'expressió de *SPOCK1* tenia algun paper en l'adquisició de resistència a inhibidors de BRAF+MEK en aquest escenari.

En primer lloc, es van analitzar les dades provinents de la cohort GSE77940 (229,292), que consisteix en les dades d'expressió (*bulkRNAseq*) de cinc mostres de biòpsies de pacients amb mutació en el gen *BRAF*^{V600E}, adquirides abans del tractament i després de l'aparició de resistència a inhibidors de BRAF i MEK (dabrafenib i trametinib, respectivament). Es va analitzar si hi havia un increment de l'expressió del gen *SPOCK1* després de la resistència al tractament comparat amb els nivells previs a aquest. Curiosament, es va observar que en el **pacient 1** (mostrava RC i 18 mesos de SLR), el **pacient 2** (malaltia estable o SD i 10 mesos de SLR), el **pacient 4** (RP i 3 mesos de SLR) i el **pacient 5** (RP i 2 mesos de SLR) mostraven un increment de l'expressió de

SPOCK1 a la resistència a inhibidors de BRAF+MEK comparat amb la mostra abans del tractament. Només el **pacient 6** (SD i 2 mesos de SLR) va mostrar un decrement de l'expressió de *SPOCK1* al comparar la mostra abans del tractament i a la resistència. Per tant, en el 80% dels pacients d'aquesta cohort l'expressió de *SPOCK1* era més elevada en el tumor en el context de la resistència que en el tumor no tractat (**Figura 42**).

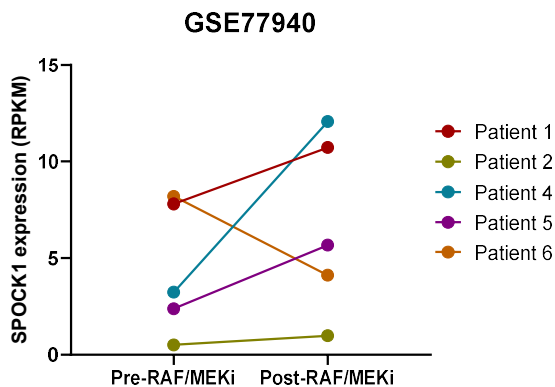


Figura 42. Expressió del gen *SPOCK1* en teixit d'una cohort de 5 pacients de melanoma abans del tractament i a la resistència a inhibidors de BRAF+MEK (GSE77940) (229,292). Les dades d'expressió gènica es representen en la normalització RPKM (*Reads Per Kilobase Million*).

Una altra cohort de pacients amb melanoma que permet validar l'expressió del gen *SPOCK1* a la resistència a teràpia dirigida és la GSE61992 (277). En aquest treball s'analitzaren teixits procedents de metàstasis de 9 pacients amb mutació del gen *BRAF*^{V600E} tractats amb la combinació de dabrafenib + trametinib, en el moment abans del tractament i a la resistència. D'aquests, 6 van presentar un augment de l'expressió de *SPOCK1* en la resistència comparat amb les mostres prèvies al tractament. Curiosament, el **pacient 2** tenia dades de dues progressions diferents i ambdues mostraven un augment de *SPOCK1* a la resistència respecte el pretractament. Les dades clíniques d'aquests pacients es mostren a la **Taula suplementària 5**. En conclusió, en aquesta cohort, el 66% dels pacients mostraven un increment de l'expressió del gen *SPOCK1* a l'adquirir la resistència als inhibidors de BRAF+MEK (**Figura 43**).

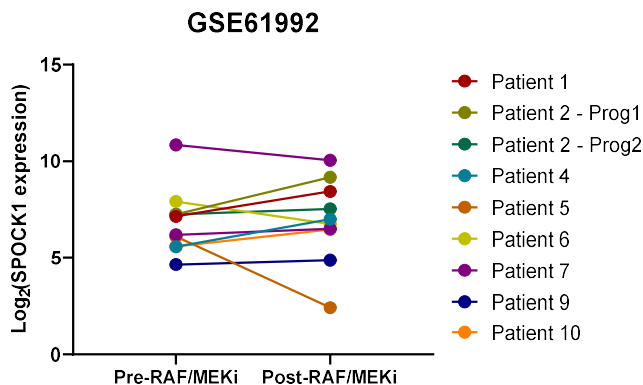


Figura 43. Expressió del gen *SPOCK1* en una cohort de 9 pacients abans del tractament i a la resistència a inhibidors de BRAF+MEK (GSE61992) (277). Les dades es representen amb el Log2 de l'expressió de *SPOCK1*, i havien estat normalitzades usant Illumina GenomeStudio v2011.1.

5. Estudis funcionals *in vitro* de la implicació de *SPOCK1* en l'adquisició de resistència i l'efecte de la seva modulació per revertir-la

5.1. Validació de l'expressió del marcador *SPOCK1* en les diferents rèpliques experimentals de resistència per tècniques directes

Per tal d'avaluar la funció del gen *SPOCK1* en el marc de la resistència a dabrafenib + trametinib, es van validar els nivells d'expressió de *SPOCK1* en les cèl·lules IGR37-S i les tres rèpliques de la línia cel·lular IGR37 resistent (IGR37-R1, IGR37-R2 i IGR37-R3). En primer lloc, es va validar l'expressió gènica de *SPOCK1* mitjançant la tècnica RT-qPCR i es va determinar que *SPOCK1* estava significativament més expressat en les tres línies resistents comparat amb la línia cel·lular sensible (**Figura 44A**). D'altra banda, també es va validar l'expressió de proteïna mitjançant la tècnica de Western Blot, mostrant una major expressió de *SPOCK1* en les línies resistents comparat amb la línia sensible (**Figura 44B**).

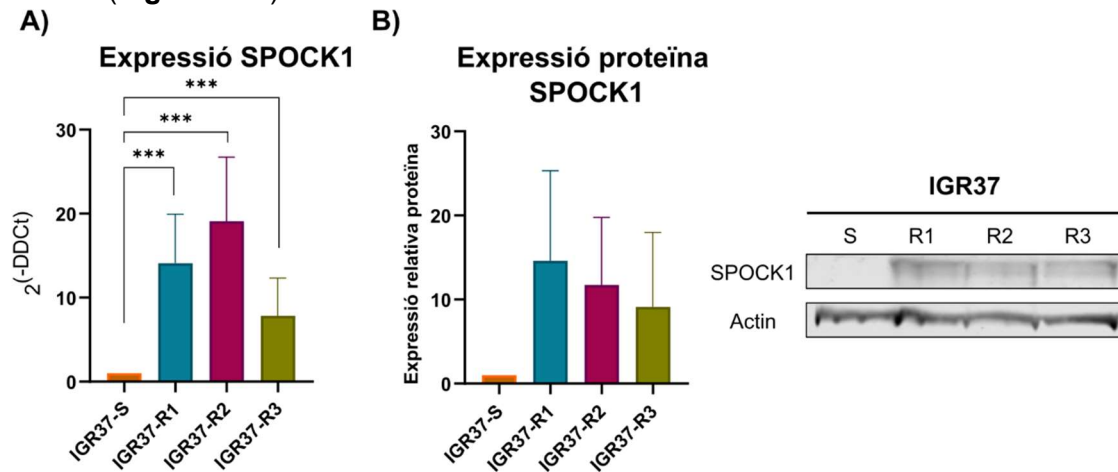


Figura 44. Nivells d'expressió gènica i proteica de *SPOCK1* en les cèl·lules IGR37-S, IGR37-R1, IGR37-R2 i IGR37-R3. **A)** Expressió relativa de *SPOCK1* mesurat mitjançant RT-qPCR (eix coordenades). Es va utilitzar la β -actina com a control. N = 6 rèpliques independents. p-valor del test t-student no aparellada; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es considera estadísticament significatiu. **B)** Nivells d'expressió relativa de la proteïna *SPOCK1* avaluats a partir de Western Blot (imatge dreta), mitjançant quantificació per ImageStudio™ (eix coordenades; esquerra). N = 3 rèpliques independents. Es va utilitzar la β -actina com a control.

5.2. Generació d'un model *in vitro* d'inhibició de l'expressió de *SPOCK1* en les cèl·lules resistents IGR37-R1

Posteriorment, es va posar a punt un model per inhibir l'expressió de *SPOCK1* en les línies cel·lulars IGR37-R1 i avaluar la funció de *SPOCK1* en la resistència d'aquestes cèl·lules a la combinació de dabrafenib + trametinib. La inhibició de *SPOCK1* es va dur a terme mitjançant la tècnica shRNA, ja que no hi havia fàrmacs disponibles al mercat que ens permetessin inhibir directament la seva expressió. Com que la tècnica shRNA dona lloc a una disminució de l'expressió però no a una inhibició completa, aquest mètode s'assimilava més a l'inhibició farmacològica, simulant una diana terapèutica per revertir la resistència a dabrafenib + trametinib. Després d'analitzar per RT-qPCR els nivells d'inhibició de *SPOCK1* usant 5 constructes diferents, els que van presentar un major grau d'inhibició van ser el constructe 93 i el 94 (**Figura 45A**). Aquests es van seleccionar per realitzar els estudis funcionals posteriors. Es van utilitzar les cèl·lules IGR37-R1 infectades amb un constructe *Non-Target* (NT) (shSPOCK1-NT) com a control. També es va validar la inhibició proteica de *SPOCK1* en els constructes shSPOCK1-93 i shSPOCK1-94 (**Figura 45B**).

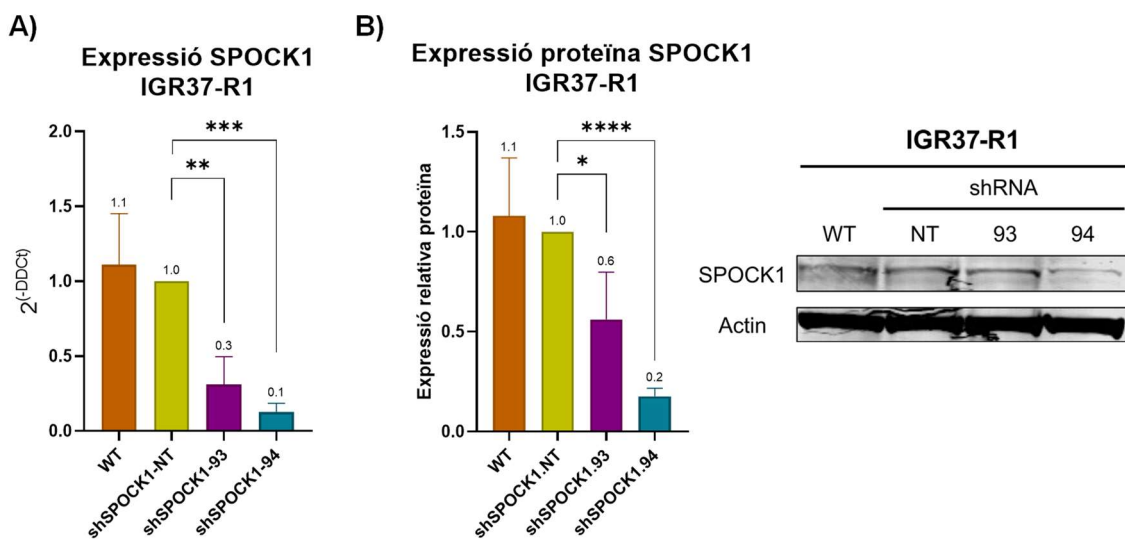


Figura 45. Nivells d'expressió gènica i proteica de *SPOCK1* en les cèl·lules IGR37-R1 *wild type* (WT), shSPOCK1-NT, shSPOCK1-93 i shSPOCK1-94. **A)** Expressió relativa de *SPOCK1* mesurada per RT-qPCR (eix de coordenades). Es va utilitzar la β -actina com a control endogen. N = 3 rèpliques independents. p-valor del test t-student no aparellada; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es considera estadísticament significatiu. **B)** Nivells d'expressió proteica relativa de *SPOCK1* avaluats a partir de Western Blot (imatge, dreta), mitjançant quantificació per ImageStudio™ (eix coordenades; esquerra). N = 3 rèpliques independents. Es va utilitzar la β -actina com a control endogen.

Les cèl·lules WT i les NT mostraven uns nivells d'expressió gènica i proteica de *SPOCK1* similars entre elles. Els constructes shSPOCK1-93 i 94 presentaven una inhibició del 70% i el 90%, respectivament, respecte els nivells d'expressió gènica de les cèl·lules

shSPOCK1-NT (**Figura 45A**). De manera similar, els nivells de proteïna de SPOCK1 s'havien reduït significativament al 40% i al 80% en shSPOCK1-93 i 94, respectivament, respecte shSPOCK1-NT (**Figura 45B**).

5.3. Assajos funcionals *in vitro* per estudiar el rol de SPOCK1 en el fenotip de resistència

5.3.1. Assajos funcionals de reversió de resistència a dabrafenib + trametinib

Una vegada validat el model d'inhibició *in vitro*, es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular a partir d'un banc de dilucions de la combinació dels fàrmacs dabrafenib + trametinib per avaluar si la inhibició de SPOCK1 revertia la resistència a aquests fàrmacs en aquest model de resistència *in vitro*. Com es pot observar a la **Figura 46**, les cèl·lules amb SPOCK1 inhibit (shSPOCK1-93 i shSPOCK1-94) no van mostrar un augment de sensibilitat a la combinació de teràpia dirigida, respecte a les control (shSPOCK1-NT), no demostrant activitat en la reversió de la resistència.

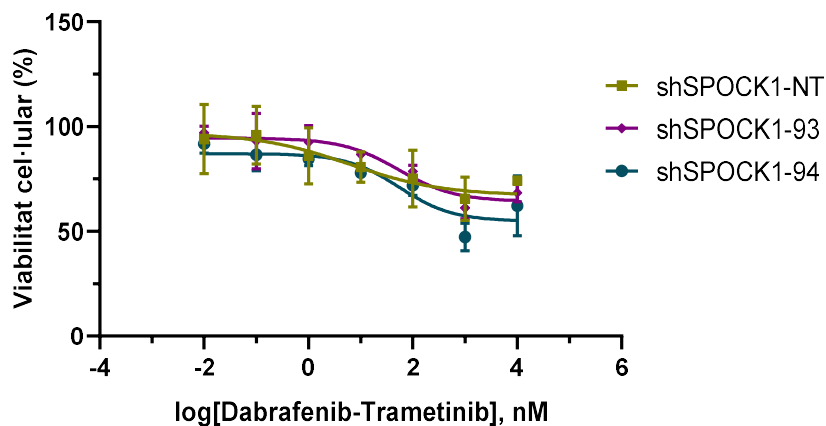


Figura 46. Avaluació del paper de SPOCK1 en la reversió de resistència a teràpia dirigida: assaig de viabilitat cel·lular per la tècnica MTT (eix coordenades) a diferents dosis de la combinació de dabrafenib + trametinib (eix ordenades), comparant cada una de les condicions experimentals del model *in vitro* d'inhibició del gen. N = 3 rèpliques independents. p-valor del test t-student no aparellada; *p-valor < 0,05 es considera estadísticament significatiu.

5.3.2. Assajos de proliferació

D'altra banda, també es van realitzar assajos de proliferació mitjançant l'avaluació de la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig MTT i es va observar que les cèl·lules shSPOCK1-93 i shSPOCK1-94 proliferaven més lentament comparat amb la condició control shSPOCK1-NT. Les diferències en proliferació més destacades es van observar entre les 48h i les 72h, essent significatives entre la condició shSPOCK1-NT i la shSPOCK1-93, i mostrant una tendència en el cas de shSPOCK1-94 (**Figura 47**).

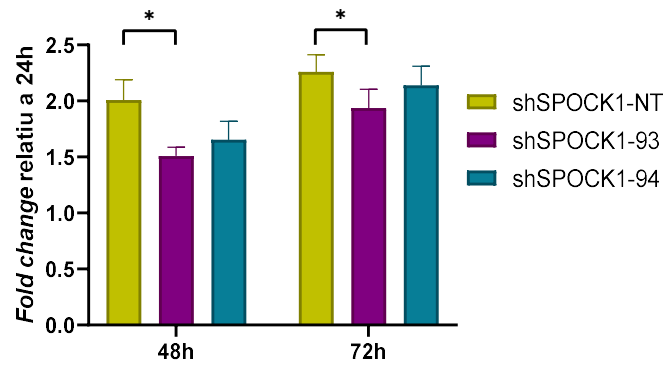


Figura 47. Estudis funcionals de *SPOCK1* en el model *in vitro* de silenciament. Anàlisi de la proliferació cel·lular mitjançant la tècnica MTT per estudiar el rol de la inhibició de *SPOCK1*. Els resultats de OD a les 48h i 72h estan relativitzats a les OD de les 24h i es representen pel *fold change* (eix coordenades). N = 3 rèpliques independents. p-valor del test t-student no aparellada; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es considera estadísticament significatiu.

5.3.3. Assajos funcionals de migració i invasió cel·lular

Posteriorment, es va analitzar si la inhibició de *SPOCK1* tenia efecte en la capacitat migratòria de les cèl·lules resistents. De fet, quan es va analitzar la capacitat de migració cel·lular a través de la tècnica de *wound healing*, es va observar que les cèl·lules amb *SPOCK1* silenciats migraven més lentament que les control shSPOCK1-NT, demostrant diferències estadísticament significatives en les shSPOCK1-94, i una tendència en les shSPOCK1-93, a les 12h i a les 24h (**Figura 48A**). En la mateixa línia, quan es va analitzar la capacitat de migració de les cèl·lules mitjançant la tècnica de *transwell*, es van observar diferències significatives, tenint en compte l'àrea migrada de les cèl·lules shSPOCK1-93 i shSPOCK1-94 comparat amb les shSPOCK1-NT a les 24h. Considerant l'àrea migrada de les cèl·lules NT com a 100%, la de les cèl·lules shSPOCK1-93 i shSPOCK1-94 va ser d'un 40% i un 50% respectivament, demostrant una migració més lenta (**Figura 48B**)

Finalment, i utilitzant de nou la tècnica de *transwell*, es va avaluar la capacitat d'invasió del model cel·lular amb *SPOCK1* inhibida i es va observar que aquesta era inferior en les cèl·lules shSPOCK1-93 i principalment en les shSPOCK1-94, en comparació amb les shSPOCK1-NT (**Figura 48C**). En el cas de les shSPOCK1-94, aquesta diferència era estadísticament significativa, essent un 40% inferior a les control. Aquests resultats van confirmar l'associació de l'expressió del gen *SPOCK1* amb una major capacitat de migració i invasió, característiques pròpies de fenotips cel·lulars de caràcter mesenquimal, afavorint la EMT, i demostrant així el seu potencial com a diana terapèutica en l'adquisició de resistència a inhibidors de BRAF+MEK, quan aquest gen està sobreexpressat.

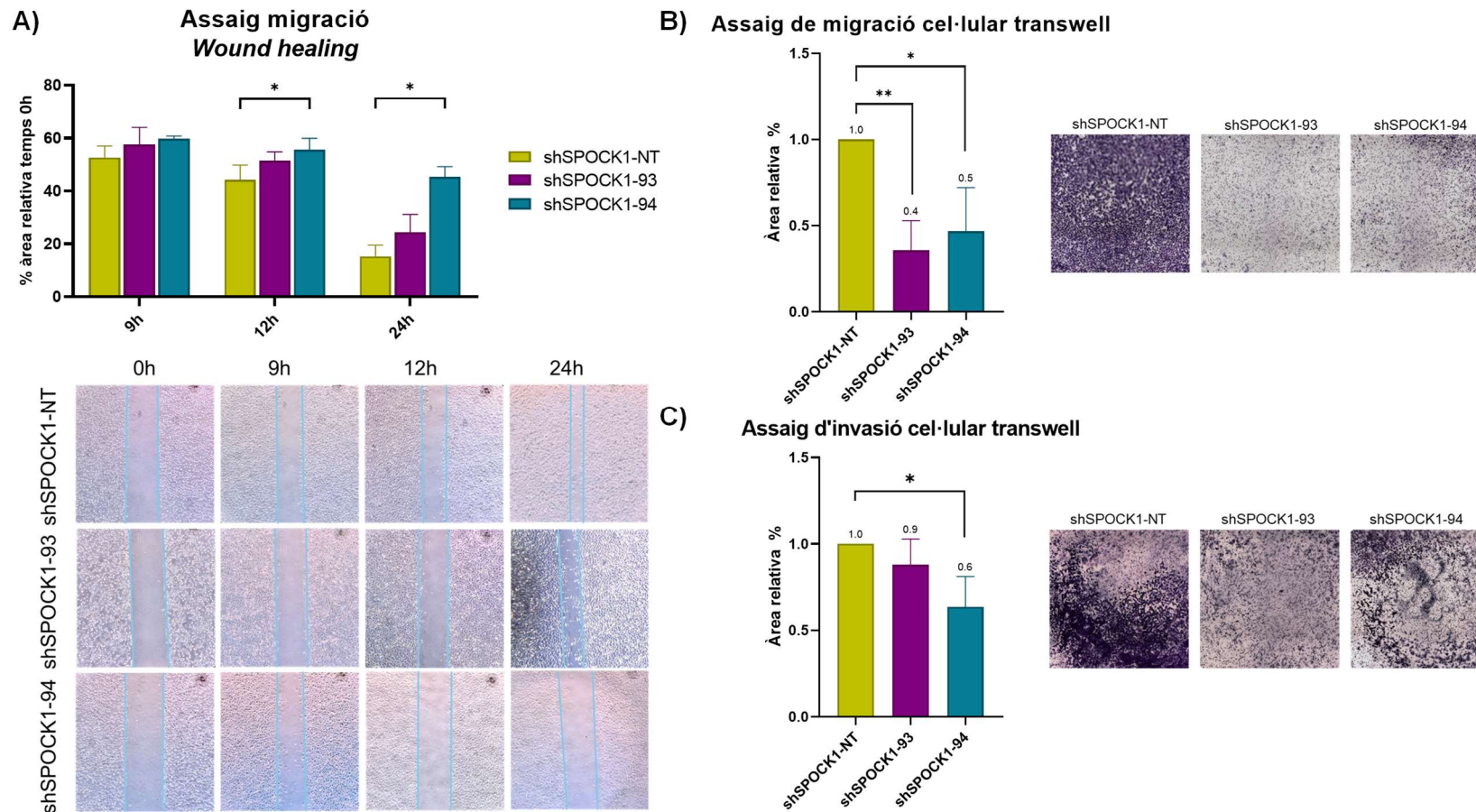


Figura 48. Estudis funcionals del rol de *SPOCK1* en un model *in vitro* de silenciament. **A)** Estudi del paper de *SPOCK1* en la migració cel·lular en els diferents models per la tècnica de *wound healing*, on es representa el % de l'àrea no ocupada per cèl·lules relativa al temps zero (eix coordenades), a diferents temps (eix ordenades). Imatges de l'àrea d'obertura de la ferida (delimitada per les línies blaves) per a cada condició a diferents temps. **B)** Estudi del rol de *SPOCK1* en la migració cel·lular mitjançant l'assaig de migració *transwell* on es representa l'àrea ocupada per les cèl·lules migrades, relativa al control negatiu a les 24h. Imatges de l'àrea migrada per a cada condició a les 24h. Els valors d'àrea ocupada es van normalitzar a la condició NT, representant aquesta el 100% d'expressió. **C)** Estudi de la funció de *SPOCK1* en la invasió cel·lular mitjançant l'assaig d'invasió *transwell* on es representa l'àrea relativa de cèl·lules amb capacitat d'invasió respecte al control negatiu a les 24h. Imatges de l'àrea ocupada per cèl·lules en cada condició a les 48h. Els valors d'àrea ocupada es van normalitzar a la condició NT, representant aquesta el 100% d'expressió. N = 3 rèpliques independents. Imatges adquirides amb microscopi òptic 4X. Quantificació per ImageJ. p-valor del test t-student no aparellada; *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 es considera estadísticament significatiu.

Discussió

ESTUDI I

Els pacients amb melanoma cutani avançat amb el gen *BRAF* mutat, tenen dues opcions terapèutiques vàlides en primera línia: la immunoteràpia, basada en ICI, o la teràpia dirigida basada en la combinació d'inhibidors de BRAF+MEK. Tot i que el desenvolupament d'aquestes teràpies ha canviat el paradigma del tractament del melanoma cutani metastàtic *BRAF* mutat, alguns pacients no obtenen el benefici esperat amb el tractament administrat. Per aquest motiu, aquest estudi se centra en la identificació de biomarcadors moleculars predictius d'eficàcia per a la selecció del millor d'ambdós tractaments, a partir d'una cohort de 27 pacients tractats amb aquests règims de teràpia.

Característiques clíniques de la cohort retrospectiva

Pel que fa a la distribució de les característiques clíniques, les dues subcohorts de tractament estaven equilibrades, a excepció de l'estat de supervivència en la cohort tractada amb inhibidors de BRAF+MEK, que tenia un enriquiment significatiu en pacients *exitus*. Aquest fet podria explicar-se si es té en compte que el temps de seguiment des del diagnòstic era superior en aquesta subcohort respecte a la d'immunoteràpia, i això hauria permès observar més events en aquesta quant a supervivència.

Si comparem la nostra subcohort de teràpia dirigida amb les incloses en els principals assajos clínics que van portar a l'aprovació de la combinació de dabrafenib + trametinib, el COMBI-v i COMBI-d (161), els percentatges quant a característiques són similars. En la nostra subcohort, la mediana d'edat era de 50 anys i amb un 57,9% del total d'homes i en els esmentats estudis, aquesta era de 55 anys i els homes representaven un 57%. Els valors de LDH també eren equivalents. Els estudis COMBI mostraven una SLP als 5 anys superior en pacients amb nivells de LDH normals, fet que, curiosament, no vam observar en la nostra cohort, on els nivells de LDH no tenien un efecte significatiu en la TLP o la SG, per cap dels dos tractaments. En relació a l'eficàcia del tractament, la taxa de RC i el TLP va ser també equivalent als de la nostra cohort. En canvi, la comparativa no era tan similar pel que fa a la supervivència global, essent més elevada la dels estudis clínics. Aquestes diferències són justificables, ja que aquests estudis van ser dissenyats específicament per a demostrar el benefici de la teràpia dirigida, amb una mida mostral adequada. En la nostra cohort, comptem amb un nombre limitat de mostres, amb un objectiu diferent, enfocat a trobar diferències moleculars de forma exploratòria i aquest fet pot generar alguns biaixos al ser avaluada clínicament.

Pel que fa a la reduïda subcohort tractada amb immunoteràpia, els percentatges de distribució de les diferents variables clíniques també eren equivalents als dels principals

assajos clínics descrits a la bibliografia (124,125,130,157,158). Cal destacar que el TLP era superior a l'observat en els esmentats estudis. Novament, aquest fet es pot explicar per la reduïda mida mostral d'aquesta subcohort.

Finalment, l'escenari més interessant a comparar és la distribució de les característiques clíniques de la nostra cohort amb les dels estudis DREAMseq i SECOMBIT, ja que aquests comparaven els règims de tractament de teràpia dirigida vs immunoteràpia. Respecte els resultats d'eficàcia del DREAMseq (171), la SLP del braç tractat amb immunoteràpia era de 11,8 mesos i de 8,5 mesos en el tractat amb dabrafenib + trametinib. Aquests resultats són similars als observats en la nostra cohort, amb una mediana del TLP de 11,9 mesos i 4,3 mesos, respectivament, essent les diferències en la subcohort tractada amb immunoteràpia explicables per la baixa mida mostral.

Tenint en compte el descrit anteriorment, es podria considerar que la nostra cohort està equilibrada entre grups a comparar, i que es comporta de forma similar a les cohorts de melanoma cutani *BRAF* mutat, tractades amb teràpia dirigida o immunoteràpia en primera línia.

Malgrat el nostre objectiu era reclutar 20 mostres de cada grup de tractament i que finalment es va reclutar un total de 45 mostres, només 27 van poder ser utilitzades per a l'estudi, i especialment només 8 es van poder analitzar en la branca de pacients tractats amb immunoteràpia. Algunes de les causes van ser que les mostres parafinades provenien de l'activitat assistencial, el qual implicava que ja havien sigut utilitzades pel diagnòstic i assajos clínics i, per tant, moltes d'elles ja estaven força gastades i amb poca representació tumoral. A més a més, el material no sempre estava en bon estat i això dificultava obtenir extraccions d'ARN de bona qualitat. Així mateix, també es va alentir el reclutament de mostres, tant de la cohort prospectiva com retrospectiva, degut a la disminució de l'activitat assistencial durant l'època de la pandèmia per la covid-19.

Identificació de gens potencials factors pronòstic en ambdues cohorts de tractament

A partir de l'anàlisi d'expressió per tecnologia Nanostring®, es pretenien identificar biomarcadors de selecció de la millor opció terapèutica en primera línia de tractament del melanoma cutani *BRAF* mutat. No obstant, es va identificar un grup de gens, l'expressió dels quals podia predir eficàcia terapèutica davant els dos tractaments. El més destacat és el comportament de *ITGB8* com a potencial factor pronòstic, l'alta expressió del qual estava associada a un baix benefici clínic i un pitjor pronòstic.

ITGB8 és una integrina que té la capacitat d'unir-se selectivament als lligands extracel·lulars dels pèptids associats a la latència del factor de creixement transformador

beta (TGF β) (293,294). El TGF β , en el microambient tumoral, promou la immunosupressió (295) ja que perjudica nombroses funcions dels limfòcits T efectors i promou el desenvolupament i l'estabilitat de les cèl·lules T reguladores (Tregs). En la bibliografia es demostra que *ITGB8* és essencial per activar el TGF β produït per les cèl·lules tumorals i promoure l'evasió immune (296). De fet, assenyalen que l'expressió de *ITGB8* en les cèl·lules T infiltrants de tumor (TILs) s'associa amb una baixa supervivència dels pacients, el qual va en la mateixa direcció que els nostres resultats. Per tant, podríem suggerir que la pitjor supervivència dels pacients amb elevada expressió de *ITGB8* es deguda a l'evasió immune que es desencadena a l'activar TGF β , independentment del tractament administrat.

D'altra banda, en la mateixa línia també es va observar que la baixa expressió de *DEFB134* correlacionava amb un TLP i una SG més perllongada. D'aquest gen hi ha molt poca informació a la bibliografia, fet que dificulta hipotetitzar sobre els mecanismes pels quals l'expressió de *DEFB134* pot afectar la supervivència en el context del melanoma metastàtic. No obstant, la proteïna que codifica per aquest gen forma part de la família de les defensines, les quals poden estar involucrades en la resposta immune innata (297).

Identificació de biomarcadors com a potencials factors predictius per a la selecció de la millor opció terapèutica

Com a objectiu principal de l'anàlisi comparativa d'expressió, finalment es va identificar a *CCL21*, *GHR* i *CXCL8* com a potencials factors predictius de la millor opció terapèutica en l'escenari descrit. La particularitat que la direcció de l'expressió d'aquests, quant a benefici clínic, fos contrària entre les dues cohorts de tractament, els postula com potencials bons biomarcadors d'eficàcia per la selecció de la millor opció terapèutica. Segons les nostres troballes, l'elevada expressió dels gens *CCL21* i *GHR* està significativament relacionada amb un baix benefici clínic en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK, i per contra, amb un alt benefici clínic a immunoteràpia.

CCL21 és una quimiocina lligand del receptor de quimiocina 7 (CCR7), juntament amb la quimiocina 19 (*CCL19*). S'ha descrit que aquest eix de quimiocines pot tenir rols oposats en el càncer segons on estigui expressat: si s'expressa en les cèl·lules tumorals indueix progressió tumoral; en canvi, si s'expressa en les cèl·lules immunes, com les cèl·lules dendrítiques o les cèl·lules T, activa respostes antitumorals (298,299). El grup de *Dubinett* i *Sharma* va proposar que *CCL21* afavoreix la localització de cèl·lules dendrítiques (DC) activades dins del tumor i que és una estratègia efectiva per restaurar la presentació d'antígens (300). Diversos estudis han demostrat que la *CCL21* juga un

paper important en la infiltració de cèl·lules T, la polarització de macròfags i la polarització dels neutròfils (301,302). De fet, en un treball realitzat amb pacients de carcinoma hepatocel·lular van determinar que CCL21 podria utilitzar-se com un biomarcador de resposta a ICI, ja que els elevats nivells de CCL21 en el microambient tumoral inhibeixen la polarització immunosupressora dels neutròfils (302). Aquests resultats van en línia amb les nostres troballes, on alts nivells d'expressió d'aquesta, estan associats amb una resposta completa a immunoteràpia.

De forma interessant, en la bibliografia s'ha utilitzat el rol d'aquesta quimiocina en la modulació immune per desenvolupar teràpies per millorar la resposta a la immunoteràpia (303). De fet, en un estudi de fase I en càncer de pulmó, s'injectaven a nivell intratumoral cèl·lules dendrítiques modificades, que expressaven CCL21, fet que va potenciar la infiltració de cèl·lules T CD8⁺, així com la inducció de respostes immunes específiques d'antigen en el tumor i un augment de l'expressió de PD-L1 tumoral (304). Actualment hi ha un altre estudi fase I en marxa on s'estudia l'efecte de la vacunació *in situ* amb cèl·lules dendrítiques autòlogues modificades per CCL21 (CCL21-DC) combinades amb pembrolizumab per al CPNM avançat (305). Altres estratègies terapèutiques que s'han estudiat són l'ús d'anti-PD-1 en combinació amb vacunes d'ADN incorporant CCL21 recombinant, on s'aconseguien millorar les respostes immunes antitumorals en un model murí de càncer cervical (306). En conclusió, en el context del tractament amb immunoteràpia es podrien utilitzar algunes d'aquestes estratègies terapèutiques per incrementar l'eficiència de la immunoteràpia en el tractament dels pacients de melanoma.

Pel que fa a la teràpia dirigida, l'expressió de *CCL21* es relaciona amb una baixa eficàcia. En aquesta línia, resultats descrits en la bibliografia determinen una correlació positiva entre l'expressió de CCR7, receptor del que CCL21 és lligand, i les metàstasis al node limfàtic en diferents tipus de càncer (30,307–311). En el cas del càncer de mama, es va demostrar que les pacients amb elevats nivells de CCR7 experimentaven una supervivència més curta (312). CCR7 pot activar les vies de senyalització de ERK1/2, PI3K/AKT, Rho GTPases, MAPK i JAK/STAT (299), les quals es caracteritzen per ser vies alternatives que s'activen durant els processos de resistència a teràpia dirigida.

D'altra banda, *Siels et al.* van demostrar que en un model murí de melanoma, alts nivells d'expressió de CCL21 en les cèl·lules tumorals es correlacionaven amb un microambient immunotolerant, el qual promovia la progressió tumoral, a través de l'activació de l'eix CCR7-CCL21-CCL19. Segons això, es podria hipotetitzar que

l'impacte de CCL21 com a biomarcador d'eficàcia terapèutica podria ser depenent de la localització intratumoral on s'expressi. De fet, un dels mecanismes de les cèl·lules tumorals per escapar de la vigilància immune és activar vies que alterin el microambient tumoral per afavorir l'activació de Tregs, fet que promou la tolerància immunològica (313).

En conclusió, el rol de CCL21 en el creixement tumoral i la immunitat antitumoral s'ha d'interpretar amb cautela. La inducció de la resposta immune pot ser específica del tumor, del microambient o dependent del moment i la quantitat en que s'allibera la quimiocina (314). Per tant, com a continuació d'aquesta tesi, seria valuós realitzar experiments complementaris per determinar l'impacte de la localització de l'expressió de CCL21 als diferents compartiments intratumorals, així com el dels nivells de CCL21 sèric per tal d'explicar el seu comportament dual com a biomarcadors predictius d'eficàcia entre el tractament amb immunoteràpia o teràpia dirigida. A la **Figura 49** es mostra el model proposat pel rol de CCL21 a partir dels nostres resultats i els descrits a la bibliografia.

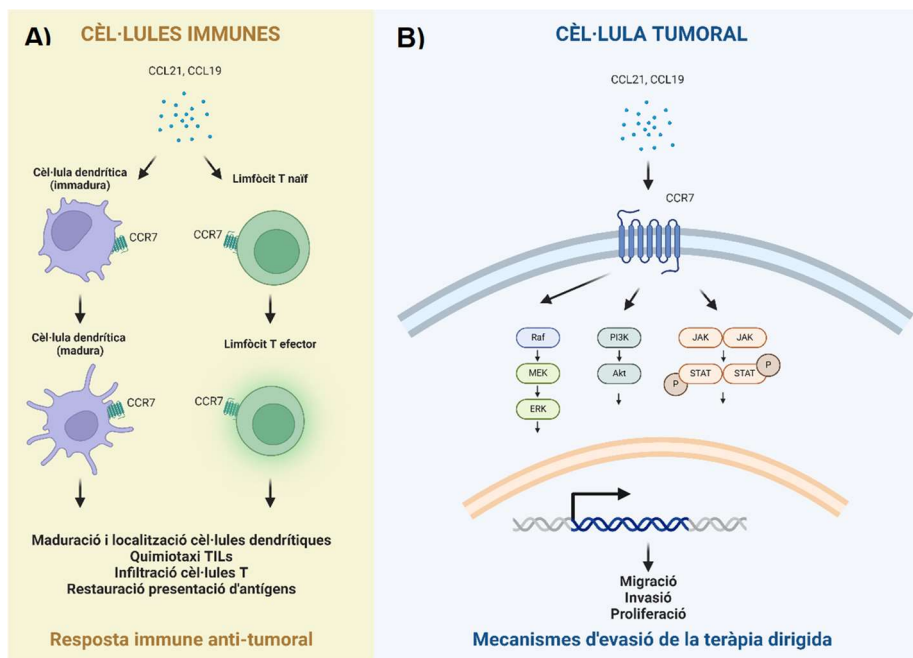


Figura 49. Model proposat del rol de CCL21 en resposta a la immunoteràpia i la teràpia dirigida en el melanoma cutani. **A)** Les quimiocines CCL19/CCL21 activen CCR7 el qual promou la maduració de les cèl·lules dendrítiques i les cèl·lules T. **B)** L'activació de l'eix CCL19-CCL21-CCR7 pot activar vies com ERK, PI3K/AKT i JAK/STAT, les quals poden activar la migració, invasió i proliferació. Figura realitzada amb BioRender.

Referent al receptor de l'hormona de creixement (GHR), segons els nostres resultats, la seva sobreexpressió correlaciona amb un baix benefici clínic i un pitjor TLP a la teràpia dirigida. L'hormona de creixement (GH), la qual està involucrada en el desenvolupament

dels òrgans i la regulació metabòlica, i el seu receptor (GHR) s'expressen en diferents càncers, inclòs el melanoma. L'acció de GH, a través de la unió a GHR, pot implicar l'activació de vies com JAK, STAT i SRC, les quals han estat àmpliament associades a resistència a inhibidors de la via MAPK (315,316). De fet, ja s'ha descrit que la interacció GH-GHR impulsa la resistència a la teràpia dirigida, el risc de metàstasi i la recaiguda del tumor mitjançant els següents mecanismes: supressió de l'apoptosi mediada per GH, l'activació de les bombes d'eflux multifàrmac ABC, el qual provoca una major capacitat d'eflux dels fàrmacs, i la inducció de marcadors de cèl·lules mare per induir un canvi de fenotip per adquirir característiques invasives mesenquimals (315,316). D'altra banda, hi ha una manca d'informació a la bibliografia a partir de la qual puguem hipotetitzar sobre l'efecte de l'expressió de *GHR* amb la resposta a la immunoteràpia.

Finalment, segons els nostres resultats, l'elevada expressió de *CXCL8* es correlaciona amb un pitjor TLP en la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia. *CXCL8*, també coneguda com IL-8, és una citocina proinflamatòria amb múltiples funcions en el microambient tumoral, com ara reclutar cèl·lules immunosupressores cap al tumor, incrementar l'angiogènesi o promoure la EMT (317). S'ha descrit a la bibliografia la correlació entre els nivells de *CXCL8* en sèrum, la càrrega tumoral i la resposta al tractament en diferents càncers (318). Segons *Sanmamed et al.* (319), *CXCL8* podria utilitzar-se com a biomarcador en sèrum per predir el benefici clínic als ICI en melanoma i càncer de pulmó no microcític (CPNM), ja que en els pacients responedors a immunoteràpia, els nivells de IL-8 decreixien entre el moment basal i la millor resposta, però augmentaven a la progressió (319). Dos estudis addicionals (320,321) van també indicar que el nivell de *CXCL8* en plasma és un factor desfavorable en la immunobiologia tumoral i pot actuar com un biomarcador predictiu independent en pacients que reben ICIs (320). Ambdós assajos reportaven que una major expressió de *CXCL8* tumoral s'associava amb un nivell més alt de *CXCL8* en plasma, un TME immunosupressor enriquit amb mieloides i la supressió de les cèl·lules T (320,321). Tots aquests resultats s'alinearien amb les nostres troballes, malgrat en el nostre estudi observem aquest fenomen només a nivells basals i en la peça tumoral. Per tant, seria interessant fer un estudi complementari de l'expressió de *CXCL8* en sèrum, per tal de determinar si no només es podria postular com un biomarcador de selecció terapèutica sinó també si podria utilitzar-se per monitoritzar el tractament, amb una tècnica menys invasiva, a nivell de sang perifèrica.

D'altra banda, pel que fa a la relació de l'expressió de *CXCL8* i la resposta a la teràpia dirigida, hi ha molt poca informació a la bibliografia i els nostres resultats presentaven una associació poc robusta. Tanmateix, en la línia de les nostres troballes, *Ruiz et al.*

van observar *in vitro* que la baixa expressió de *CXCL8* s'associava a resistència adquirida a inhibidors de BRAF+MEK, traduït com una manca d'eficàcia del tractament, però no presentaven resultats de resposta associada a resistència intrínseca (322).

Característiques clíniques de la cohort prospectiva i validació dels biomarcadors

Per a la validació dels nostres biomarcadors, es pretenia recollir prospectivament una cohort de pacients equivalent a la de descobriment. No obstant, no s'ha pogut complir del tot l'objectiu, en part, per la pandèmia provocada pel covid-19, que va limitar la inclusió de casos, i en major part, degut al canvi de paradigma en el tractament adjuvant del melanoma cutani. Gràcies a l'evidència demostrada en diferents assajos clínics (148,151–153), al llarg de la consecució del present estudi (entre 2020-2024), els pacients amb melanoma cutani en estadis III, seguits dels estadis IIB/IIC, es van començar a tractar amb immunoteràpia adjuvant. Aquest fet, ha afavorit l'augment de la supervivència dels pacients, reduint el nombre de casos en fase metastàtica, que era el context d'ús dels nostres biomarcadors en l'estudi. Per aquest motiu, en la majoria de casos recollits (14 dels 26 pacients), el bloc tumoral era al diagnòstic, previ a rebre immunoteràpia adjuvant, no podent validar els marcadors en el context pal·liatiu, com estava previst.

En conseqüència, es va optar per estudiar de manera exploratòria si els biomarcadors candidats podien tenir també un efecte predictiu d'eficàcia terapèutica en la immunoteràpia adjuvant. Curiosament, l'expressió de CCL21 correlacionava amb no sofrir una recaiguda tumoral, així com amb la supervivència lliure de recaiguda. Els resultats obtinguts en teràpia adjuvant encaixarien amb les funcions descrites anteriorment per CCL21 en el context de la immunoteràpia pal·liativa (303–306). El fet que CCL21 tingui també impacte en el context adjuvant, on no existeix tumor macroscòpic, podria fer pensar que el paper predictor positiu de CCL21 enfront la immunoteràpia es produeix en les cèl·lules immunes del microambient i no a les cèl·lules tumorals, fet que encara emfatitzaria més l'interès d'estudiar-lo en el sèrum.

Malgrat no hem pogut validar els nostres resultats en una cohort metastàtica, cal destacar la importància d'identificar biomarcadors pronòstics i predictius d'eficàcia a les teràpies disponibles per aquest nou context adjuvant. Igualment, i encara que actualment la teràpia dirigida adjuvant no està aprovada a Espanya, hi ha diversos assajos clínics, com el COMBI-AD (142), que reporten una millor supervivència també en pacients *BRAF* mutats tractats amb dabrafenib + trametinib comparat amb placebo. Així doncs, podríem suggerir també en teràpia adjuvant que determinar biomarcadors amb rol dual per a ambdues teràpies, podria identificar pacients que es beneficiarien de

la teràpia dirigida enfront la immunoteràpia, podent obrir una nova finestra d'oportunitat d'aprovació de la teràpia dirigida, que sí que està aprovada a Europa en aquest escenari clínic.

És important remarcar que es va utilitzar una tècnica d'anàlisi d'expressió gènica directa, com és la RT-qPCR, amb una alta especificitat i sensibilitat, i ja disponible a la pràctica clínica, per a garantir la potencial translació dels biomarcadors al context hospitalari, de forma senzilla i cost-efectiva.

ESTUDI II

Canvis de fenotip cel·lular com a mecanisme no genètic d'adquisició de resistència a teràpia dirigida

En el context del tractament del melanoma *BRAF* mutat metastàtic, i en la línia dels objectius de l'estudi I, el percentatge de pacients que inicialment es beneficien del tractament amb inhibidors de BRAF+MEK és al voltant d'un 70%. No obstant això, la majoria d'aquests acaben sofrint una progressió de la malaltia entre els 9-12 mesos de tractament, a causa de l'adquisició de resistències secundàries. En el present estudi, ens hem centrat en estudiar mecanismes transcripcionals no genètics implicats en l'adquisició de resistència a aquesta teràpia, utilitzant un model *in vitro* i una tecnologia innovadora que permet analitzar l'evolució tumoral a nivell de cèl·lula individual, essent de gran utilitat per entendre la dinàmica d'aquests processos tan complexos, i en els que intervenen un gran ventall de factors. Gràcies a aquesta anàlisi, vam poder observar un empobriment de clons cel·lulars amb expressió de gens associats amb la diferenciació del melanoma en la condició de resistència, i un enriquiment de clons amb fenotips cel·lulars de tipus "invasiu" i "mesenquimal". En aquest context, les nostres troballes estan en línia amb altres treballs descrits en la bibliografia (194,228–231), que destaquen la importància dels canvis de plasticitat cel·lular associats a l'aparició de resistència al tractament a teràpia dirigida en melanoma. Aquests canvis de fenotip cel·lular com a mecanismes de resistència terapèutica s'associen amb l'activació de múltiples vies que tenen un paper central en l'adaptació a l'estrès de les cèl·lules canceroses (241). De fet, s'han descrit també en altres tipus de càncer i per altres teràpies (323–327), fet indicatiu que pot ser un mecanisme de resistència no només propi del melanoma i de la teràpia dirigida.

Seguint en el mateix escenari, tant el nostre com els treballs publicats coincideixen en que els melanomes resistents amb cèl·lules de fenotip tipus invasiu mostren baixos nivells d'expressió de MITF però alts nivells de NF-κB i AXL (328). El balanç entre MITF i AXL ha estat àmpliament descrit com un mecanisme adaptatiu de les cèl·lules tumorals

enfrent la pressió terapèutica, essent el context MITF^{baix} i AXL^{alt} característic de la resistència (226,328,329). Així doncs, i en línia amb la bibliografia, en l'estat sensible observem alts nivells d'expressió de MITF i d'altres gens implicats amb la pigmentació i amb el llinatge del melanoma com, MLANA, S100B i SOX10, així com els baixos nivells d'AXL (224,230,231,234,330).

En l'adquisició de resistència, és important indagar també en el paper del sistema immune. La pèrdua d'expressió de gens propis de la identitat del melanoma, com són MITF, MLANA o S100B, es pot traduir també en una pèrdua d'antígens tumorals, fet que suggereix una pèrdua d'acció antitumoral del sistema immune per immunoevasió del tumor, que afavoriria la seva progressió (271,331). Malgrat el seu interès, aquest punt no s'ha pogut comprovar en aquesta tesi, per falta de context immunitari en el nostre model *in vitro*, però es podria plantejar amb l'ús de models més avançats, basats en cocultius d'esferoides o *in vivo*.

Tenint en compte les nostres troballes i les anteriorment publicades, en aquesta tesi concloem que el canvi de fenotip cel·lular és un important mecanisme d'adquisició de resistència al llarg del tractament, no essent exclouent que se'n donin d'altres simultàniament. L'enriquiment dels estats cel·lulars més mesenquimals en les cèl·lules resistents podrien ser causats per una selecció de clons cel·lulars ja preexistents abans del tractament (darwiniana), o bé a una inducció lamarckiana, on les cèl·lules adoptarien aquests fenotips com a mecanisme d'adaptació a la pressió terapèutica, de manera dinàmica i plàstica (49). Degut a que en el nostre estudi no hem pogut analitzar els estats cel·lulars intermedis durant l'adquisició de resistència, no podem afirmar quins són els mecanismes que s'estan donant en la fase de tolerància al fàrmac, prèvia a l'adquisició de la resistència estable. No obstant, tal i com es descriu bibliogràficament, probablement les cèl·lules pateixin canvis adaptatius que comporten l'alentiment del cicle cel·lular i característiques pròpies de les cèl·lules de la cresta neural, que confereixen tolerància al fàrmac (194,223,236). De fet, cal destacar que en la nostra anàlisi observem un petit enriquiment de clons cel·lulars amb signatures d'estat intermedi en la resistència, en comparació amb les cèl·lules sensibles, on la seva presència és mínima, enfortint la viabilitat d'aquesta hipòtesi. A més a més, el procés de resistència probablement és anàleg al que es produeix en les cèl·lules progenitores durant el desenvolupament. De manera similar, les cèl·lules mare tumorals (CSC) poden activar gens essencials per la supervivència i la proliferació i en els processos de resistència se segresten aquests programes del desenvolupament, que normalment també estan silenciats en els processos de diferenciació i es dona aquest canvi de fenotip, de sensible a resistent (192,332–335). Malgrat l'interès d'aquests processos,

l'objectiu d'aquesta tesi està centrat en l'anàlisi dels mecanismes que es donen en l'adquisició de la resistència estable, amb una visió més translacional, ja que és en aquest escenari on podem incidir en el camp terapèutic, amb el potencial desenvolupament de noves teràpies diana, així com identificar biomarcadors que ens permetin monitoritzar l'aparició de clons resistents.

És important remarcar que, mitjançant la tècnica *scRNAseq*, hem obtingut informació en el context de sensibilitat i a l'adquisició de la resistència de forma estable, però no hem fet un seguiment de si els clons finals/resistents provenen directament dels inicials que tenien el mateix fenotip cel·lular. Tanmateix, es podria considerar que aquests clons inicials ja tenien característiques que eren avantatjoses i que per això el cultiu cel·lular resistent s'ha enriquit amb clons d'aquestes característiques, propícies per a la supervivència davant el fàrmac.

Finalment, cal comentar que s'ha demostrat la importància dels mecanismes no genètics en l'adquisició de resistència a aquestes teràpies (192–194), però que en un alt percentatge de casos, els mecanismes d'adquisició de resistència a teràpia dirigida es donen de manera genètica, a través de l'aparició de mutacions. Durant les últimes dècades, els mecanismes genètics han estat el focus principal de la recerca en aquest camp (336,337). Aquest és un dels motius pels quals aquesta tesi se centra exclusivament en elucidar els mecanismes transcriptòmics i de canvis de fenotip cel·lular en l'adquisició de resistència, obviant els motius mutacionals. Malgrat això, i tenint en compte la importància de les mutacions de reactivació de la via MAPK en la resistència als seus inhibidors, vam realitzar un petit estudi exploratori d'enriquiment d'expressió de gens de la via en l'estat de resistència. En aquest estudi no vam observar cap troballa destacable, a part d'un enriquiment de l'expressió del gen que codifica per EGFR en els clons resistents. Igualment, per completar les nostres interessants troballes, seria d'interès realitzar un estudi genètic del nostre model, per descartar que alguns dels efectes observats estiguin associats a fenòmens mutacionals.

Rol del gen *SPOCK1* com a biomarcador de resistència adquirida a inhibidors de BRAF+MEK

Gràcies a l'anàlisi per *scRNAseq*, vam poder associar l'expressió del gen *SPOCK1* amb l'adquisició de resistència a teràpia dirigida, ja que vam detectar un enriquiment de clons cel·lulars que expressaven el gen en aquest context. El fet que ja observéssim menys d'un 5% de clons que també expressaven el gen en les cèl·lules sensibles, podria suggerir que s'ha produït una selecció darwiniana d'aquestes cèl·lules, encara que no podem afirmar que siguin exactament els mateixos clons, ni descartar que aquesta

característica s'hagi adquirit en la fase de tolerància. Si ens guiem per les dades analitzades *in silico*, on sí es podien analitzar estats cel·lulars intermedis, l'expressió de *SPOCK1* augmentava progressivament al llarg de l'adquisició de la resistència, fet que defensaria la teoria de la selecció clonal darwiniana.

El que sí podem afirmar és que els clons cel·lulars que expressen *SPOCK1*, tant a les sensibles com a les resistents, són de fenotip mesenquimal. Aquestes troballes estan en línia amb la bibliografia, quant a les signatures de plasticitat de fenotip cel·lular ja descrites (231). En tots els models *in vitro* analitzats, tant experimentalment com *in silico*, *SPOCK1* apareix sobreexpressat en les cèl·lules resistents de fenotip mesenquimal.

Pel que fa a l'impacte de *SPOCK1* com a biomarcador en l'entorn clínic, malauradament, en el nostre estudi no es van poder recopilar mostres de pacients en el moment de la progressió a la teràpia, i no es va poder corroborar. No obstant, vam poder replicar aquest model en dades de pacients procedents de repositoris públics, en les que en un alt percentatge de casos s'observava l'augment de l'expressió del gen a la progressió en mostres aparellades, postulant a *SPOCK1* com un prometedor biomarcador d'adquisició de resistència a teràpia dirigida, possiblement associada, almenys parcialment, a la plasticitat cel·lular per canvis de fenotip sota la pressió terapèutica.

Rol del gen *SPOCK1* com a potencial diana terapèutica en l'escenari de l'adquisició de resistència a teràpia dirigida

SPOCK1 codifica per un proteoglicà implicat en diversos processos cel·lulars, incloent l'adhesió i la migració cel·lular. Pot interactuar amb components de la matriu extracel·lular i modular el seu entorn promovent canvis en l'adhesió cel·lular i l'arquitectura citoesquelètica (289,338). Diversos estudis han demostrat que *SPOCK1* està sobreexpressat en diferents tipus de càncer, com el càncer de mama, el càncer de pulmó, càncer colorectal i el glioma (284,339–341).

En la bibliografia s'ha descrit que l'expressió de *SPOCK1* està involucrada en la progressió tumoral en càncer de mama en experiments *in vitro* i *in vivo*, així com en carcinoma hepatocel·lular *in vitro* (283,284). Particularment, en models preclínic de càncer de mama, es va observar que la inhibició de *SPOCK1* reduïa l'activitat de la via MAPK, disminuint així la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals (284). També s'ha associat a proliferació, migració i invasió tumoral en càncer de pròstata, càncer gàstric, càncer colorectal a nivell *in vitro* i *in vivo* i càncer de pulmó a nivell *in vitro* (285–287,340,342).

Cal destacar que diverses publicacions han reportat la implicació de *SPOCK1* en el procés de EMT *in vitro* (281,288) i *in vivo* (285,287,289,290). Mitjançant la via TGF- β ,

es produeix l'activació de *SPOCK1*, que al seu torn regula els factors de transcripció Snail i Slug, inductors de la EMT a través de les vies de senyalització de PI3K/AKT i Wnt/ β -catenina (289). Aquests resultats estan en línia amb les nostres troballes, que demostren en el model d'adquisició de resistència a teràpia dirigida, que la modulació de l'expressió de *SPOCK1* afecta a la capacitat de proliferació, migració i invasió cel·lular, corroborant la seva associació amb clons cel·lulars mesenquimals i invasius, que podria explicar-se per la seva implicació en els fenòmens de EMT.

Pel que fa a l'efecte que pot exercir *SPOCK1* en la via de les MAPK, on actuen els inhibidors de BRAF i MEK, per entendre el seu impacte directe amb els mecanismes moleculars d'adquisició de resistència, *SPOCK1* podria activar vies de senyalització com PI3K/AKT, que són crítiques per a la supervivència cel·lular i la resistència a l'apoptosi induïda per teràpia (284,339). Com ha estat àmpliament descrit, l'hiperactivació d'aquesta via és un mecanisme de resistència a aquests inhibidors (242,243). Per tant, la sobreexpressió de *SPOCK1* podria incidir en la resistència terapèutica a través d'aquest mecanisme. No obstant això, segons els nostres resultats, la inhibició de *SPOCK1* no implicaria la reversió de la resistència a inhibidors de BRAF+MEK. Aquest fet ens fa hipotetitzar que l'expressió d'aquest gen potser no té una funció directa en les vies moleculars implicades en el procés de resistència, sinó que seria un efecte indirecte, a partir de la seva robusta associació amb els fenotips cel·lulars mesenquimals, seleccionats al llarg del procés de resistència no genètica. Per tant, seria un biomarcador de resistència com a conseqüència de l'adquisició d'aquesta per canvi de fenotip cel·lular de caire invasiu i mesenquimal, més que una alteració associada amb la causa molecular de la seva aparició.

Independentment d'això, i d'acord amb l'efecte que la inhibició de *SPOCK1* mostra *in vitro*, tant en l'alentiment de la proliferació, com en la progressió tumoral, aquest podria postular-se com a una potencial diana terapèutica, en el context de l'adquisició de resistència a la teràpia dirigida amb expressió elevada del gen. De fet, a la bibliografia s'han descrit diferents estratègies per inhibir *SPOCK1* farmacològicament de forma indirecta i que podrien utilitzar-se en el context del melanoma. Per exemple, en el treball de *Chien et al.*, s'ha descrit que la apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona) pot inhibir la proliferació, migració i invasió de cèl·lules de càncer de pròstata *in vivo* i *in vitro* (287). En aquest estudi defineixen que la apigenina és una diana directa de *SPOCK1* i que inhibeix les metàstasis mitjançant la inactivació de EMT, la qual s'activa a través de l'eix Snail/Slug. Una altra estratègia descrita és l'ús de microRNAs, que són petits ARNs no codificants conservats evolutivament que poden regular l'expressió gènica i la traducció de proteïnes. S'han caracteritzat diversos microRNAs com a dianes de *SPOCK1*, la

inhibició de la qual podia regular la progressió, agressivitat i proliferació en diferents tipus de càncer (343–346).

No s'ha de perdre de vista però, que amb la finalitat de validar amb robustesa aquesta potencial vulnerabilitat terapèutica, seria necessari replicar les nostres interessants troballes en models més avançats tant *in vitro* com *in vivo*. Així mateix, testar l'efecte dels potencials inhibidors de SPOCK1 descrits en la bibliografia o altres directament associats amb la seva senyalització, per corroborar que podria ser una nova diana terapèutica candidata en el context del melanoma *BRAF* mutat resistent a la teràpia dirigida.

Finalment, i a partir de les troballes realitzades durant aquesta tesi doctoral, hipotetitzem un putatiu model dels mecanismes d'adquisició de resistència a teràpia dirigida i del paper de SPOCK1 (**Figura 50**).

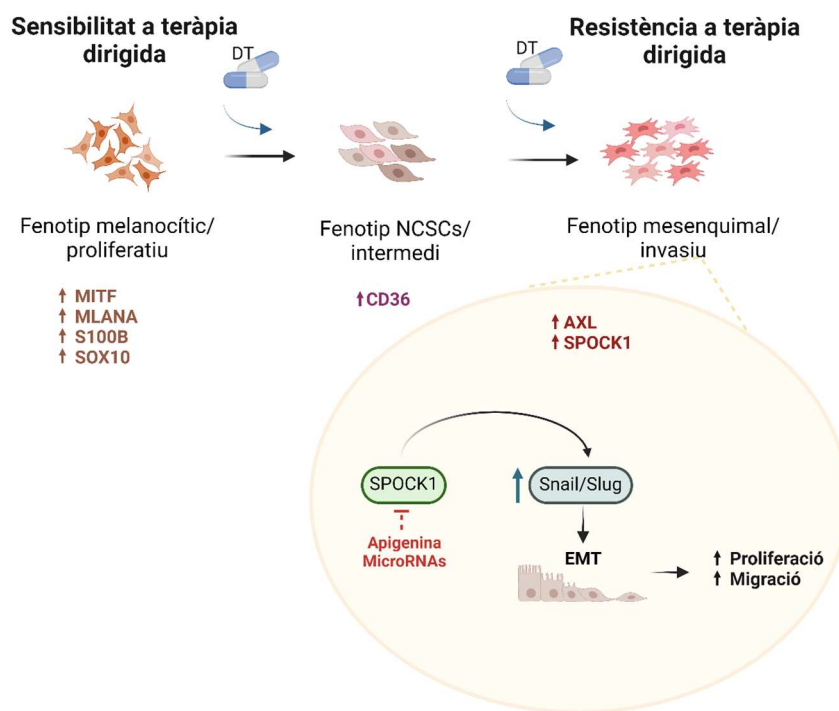


Figura 50. Model proposat dels mecanismes d'adquisició de resistència a teràpia dirigida en les cèl·lules tumorals de melanoma i la funció de SPOCK1 en aquest procés. Breument, la sobreexpressió de SPOCK1 en la condició de resistència apareixeria com a conseqüència d'un augment de clons cel·lulars amb fenotip "invasiu"/"mesenquimal", i en aquest context el nostre candidat actuaria com a potenciador de la transició epiteli mesènquima, afavorint la proliferació, migració i invasió cel·lular. La inhibició de SPOCK1 alentiria aquests processos, essent una potencial vulnerabilitat terapèutica a la resistència a inhibidors de BRAF+MEK. Figura realitzada amb BioRender.

LIMITACIONS DEL PROJECTE I ESTRATÈGIES FUTURES

Estudi I

La principal limitació de l'estudi I és la reduïda mida mostral de la subcohort tractada amb immunoteràpia en la cohort retrospectiva, així com el baix nombre de casos metastàtics en la cohort prospectiva. En el primer punt, i malgrat que es van incloure més de 15 casos tractats amb immunoteràpia només 8 van poder ser analitzats a causa principalment de la qualitat de la mostra i del material genètic derivat. Això no obstant, el fet de poder comparar els biomarcadors amb els obtinguts en la subcohort de teràpia dirigida, va augmentar la robustesa d'aquests, podent determinar *CCL21* com a un biomarcador prometedor en el context de la immunoteràpia. Respecte a la cohort prospectiva, el canvi de paradigma en el tractament cap a la teràpia adjuvant, que ha implicat l'augment de pacients metastàtics pretractats amb immunoteràpia adjuvant, no ens ha permès validar la signatura de gens amb factor pronòstic amb l'objectiu de seleccionar la millor opció terapèutica identificada en la cohort de descobriment. Malgrat aquesta realitat, s'han pogut analitzar en teràpia adjuvant que, a dia d'avui, és un context clínic de gran interès en el futur de la terapèutica del melanoma. Si més no, els nostres candidats van ser identificats en un context de malaltia metastàtica i per aquest motiu i com a una de les futures línies de recerca, es reclutaran més mostres de casos metastàtics de forma retrospectiva, tant tractades amb immunoteràpia com amb teràpia dirigida. Ho realitzarem amb l'ajut d'altres centres i en l'entorn del Grupo Español Multidisciplinar del Melanoma (GEM) per tal d'elucidar la seva rellevància i potencial aplicabilitat en la selecció de la millor opció terapèutica en la malaltia avançada.

Una altra línia d'interès futur és la validació dels 3 biomarcadors, principalment les 2 quimiocines (*CCL21* i *CXCL8*), en el plasma dels pacients de la cohort prospectiva que s'han obtingut al llarg del projecte, en diferents punts del tractament, per explorar la correlació entre els nivells de quimiocina en el tumor i els alliberats perifèricament. Això ens permetrà elucidar la possibilitat d'utilitzar aquests biomarcadors per a monitoritzar l'eficàcia terapèutica de manera menys invasiva. Actualment s'està continuant amb la recollida de mostres de sang dels casos nous, per tal d'augmentar la mida mostral d'aquest futur projecte. Així mateix, especialment en el cas de *CCL21*, pretenem identificar en quin compartiment tumoral s'està expressant, així com altres biomarcadors relacionats amb la seva via. Per estudiar-ho, es realitzarà una anàlisi *in situ* en algunes de les mostres parafinades de la cohort retrospectiva mitjançant la tècnica *spatial transcriptomics* o, en el cas que no sigui possible, la tècnica d'immunohistoquímica.

Estudi II

Una de les limitacions d'aquest estudi és que els experiments *in vitro* per estudiar la resistència als inhibidors de BRAF+MEK es van realitzar només en una línia cel·lular i la seva parella resistent. Encara que vam fer 3 rèpliques independents per la línia IGR37-R, per augmentar la robustesa dels candidats, seria important poder validar els nostres resultats en un altre model de resistència. Per aquest motiu, tenim previst realitzar estudis funcionals en la línia cel·lular MM074 i la seva parella resistent a inhibidors de BRAF+MEK, la línia MM074-R, que està comercialment disponible. La línia cel·lular MM074 prové d'un cultiu primari estabilitzat, de la metàstasi del node limfàtic d'una pacient amb melanoma cutani, que s'ha caracteritzat mitjançant un *scRNAseq* i expressa baixos nivells de *SPOCK1*, ja que s'ha associat a fenotips intermedis o transitoris (**Figura 38**). En aquesta línia, volem estudiar si els nivells d'expressió de *SPOCK1* augmenten en la línia resistent i volem realitzar estudis funcionals per validar si *SPOCK1* té també un efecte en la proliferació, migració i invasió cel·lular, així com en la reversió de la resistència a teràpia dirigida.

Encara que hem usat una tecnologia puntera per analitzar la resistència no genètica a teràpia dirigida en el nostre model, aquesta no ens ha permès estudiar quins canvis genètics s'han donat. Per aquest motiu, com a continuació del projecte, tenim previst dur a terme, en les mostres en el mateix moment de la resistència, una anàlisi mutacional mitjançant la tecnologia *whole exome sequencing* (WES), així com realitzar una anàlisi de l'estat de metilació per la tecnologia de *microarrays* d'Illumina. Integrant totes les dades podrem elucidar si les troballes obtingudes en aquesta tesi són només degudes a causes transcriptòmiques i de canvi de fenotip cel·lular, o si hi estan intervenint altres alteracions de caire (epi)-genètic.

Respecte a la utilitat de *SPOCK1* com a biomarcador, una limitació del nostre estudi és no haver aconseguit mostres tumorals de pacients a la progressió del tractament amb teràpia dirigida, per verificar les troballes *in vitro*. Tot i això, hem pogut fer un estudi exploratori del potencial del nostre biomarcador en dades *in silico*, corroborant en bona part les nostres troballes. Per completar l'estudi, i en el marc de la cohort prospectiva que hem anat recollint, pretenem activar un protocol per recollir mostres tumorals basals i, en els casos que sigui possible, a la resistència a teràpia dirigida. En el recull de mostres aparellades pretenem validar si l'expressió de *SPOCK1* incrementa en la resistència respecte els nivells basals, així com realitzar un potencial estudi d'aquest en biòpsia líquida, per a monitoritzar l'efectivitat del tractament durant el temps d'administració i detectar l'aparició de resistència de forma primerenca.

D'altra banda, per tal de dilucidar el potencial impacte de *SPOCK1* com a vulnerabilitat terapèutica, és necessari traslladar els resultats obtinguts en el nostre model cel·lular 2D a models *in vitro* 3D més avançats, així com en models *in vivo*. El model d'esferoides es presenta com una bona alternativa, ja que, a més, ens permet estudiar l'efecte de la inhibició del gen en la infiltració immunitària, mitjançant un cocultiu amb PBMCs de pacients. Addicionalment, tenim planejat estudiar l'ús d'alguns dels inhibidors de *SPOCK1* o inhibidors implicats en la seva via d'acció, descrits a la bibliografia, en models murins per determinar si podrien ser utilitzats com una opció terapèutica pels pacients en el context del melanoma resistent a teràpia dirigida.

Per identificar aquests inhibidors alternatius volem realitzar una anàlisi d'alt rendiment per la tècnica *bulkRNAseq* entre les línies control (NT) i les cèl·lules transfectades que tenen *SPOCK1* inhibit, per tal d'elucidar les vies de senyalització afectades per la seva acció i així proposar noves dianes terapèutiques en aquest escenari.

Conclusions

Estudi I

1. L'Anàlisi de l'expressió gènica diferencial entre pacients amb melanoma metastàtic amb mutació en el gen *BRAF*, amb diferents nivells d'eficàcia terapèutica al tractament amb teràpia dirigida o immunoteràpia, ha permès identificar un conjunt de candidats (*CCL21*, *GHR*, i *CXCL8*) que es postulen com a biomarcadors, de manera individual i en forma de signatura, per a la selecció de la millor opció terapèutica personalitzada:

1.1. L'expressió augmentada de *GHR* i *CCL21*, així com l'expressió reduïda de *CXCL8* s'associen amb un alt benefici clínic, millor TLP i SG a la teràpia dirigida i tenen l'efecte contrari a la cohort d'immunoteràpia.

1.2. L'expressió de *GHR*, *CCL21* i *CXCL8* té capacitat predictiva d'eficàcia com a signatura per la selecció de la millor opció terapèutica en la cohort retrospectiva.

2. L'expressió de *CCL21* ha demostrat un efecte predictiu positiu davant el tractament amb immunoteràpia adjuvant en una cohort prospectiva independent de melanoma *BRAF* mutat localment avançat, postulant-se com un biomarcador d'eficàcia terapèutica prometedora.

2.1. No s'ha validat l'efecte de l'expressió *CXCL8* i s'ha observat una tendència en l'expressió de *GHR* en el règim d'immunoteràpia adjuvant.

2.2. No ha estat possible realitzar la validació del paper dels 3 gens, individualment o com a signatura, com a biomarcadors de la millor opció terapèutica en malaltia metastàtica per manca de mida mostral i pel canvi de paradigma del tractament de la malaltia avançada.

Estudi II

1. Mitjançant l'anàlisi transcriptòmica per la tècnica de *scRNAseq* en el model *in vitro*, s'ha determinat l'existència de mecanismes de resistència no genètics, associats a canvis de fenotip cel·lular en el moment de l'adquisició de resistència estable a teràpia dirigida.

1.1. Mitjançant l'anàlisi d'ontologia gènica, s'ha observat que en l'adquisició de resistència a teràpia dirigida hi ha una pèrdua de clons cel·lulars amb expressió de gens associats a la diferenciació del melanoma, així com un enriquiment de processos associats a la transició epiteli mesènquima.

- 1.2. L'anàlisi de GSEA corrobora el canvi de fenotip cel·lular al llarg del procés de resistència, revelant un enriquiment de clons cel·lulars amb fenotip de tipus "invasiu" i "mesenquimal" en la resistència, enfront els fenotips "proliferatius" i "diferenciats" enriquits en els clons sensibles, segons les signatures ja descrites a la bibliografia.
2. S'ha identificat al gen *SPOCK1* com a potencial biomarcador d'adquisició de resistència a teràpia dirigida, ja que la seva expressió està enriquida en els clons cel·lulars a la resistència.
 - 2.1. L'expressió de *SPOCK1*, gen prèviament associat a la transició epiteli mesènquima, correlaciona amb els clons cel·lulars amb fenotip mesenquimal en el nostre model.
 - 2.2. Aquests resultats es corroboren en dades *in silico*, tant en altres models cel·lulars de melanoma, com en mostres tumorals de pacients, que mostren sobreexpressió del gen a la progressió a la teràpia dirigida.
3. No s'ha pogut demostrar la implicació directa del gen *SPOCK1* en els mecanismes moleculars que provoquen l'adquisició de resistència, ja que la seva inhibició no provoca la reversió de resistència als inhibidors de BRAF+MEK, no tenint així un efecte sinèrgic.
4. La inhibició del gen *SPOCK1* produeix un alentiment de la proliferació cel·lular, així com un decrement de la capacitat de migració i invasió en la línia resistent. Aquestes troballes posicionen al gen *SPOCK1* com a una potencial diana terapèutica, que es podria aplicar en el context de la resistència a teràpia dirigida, amb sobreexpressió del gen.

Bibliografia

1. Chacón M, Pfluger Y, Angel M, Waisberg F, Enrico D. Uncommon Subtypes of Malignant Melanomas: A Review Based on Clinical and Molecular Perspectives. *Cancers*. 2020 Sep;12(9):2362.
2. Strashilov S, Yordanov A. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 15;22(12):6395.
3. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2024 Feb 24]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
4. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1071–80.
5. Douki T. Oxidative Stress and Genotoxicity in Melanoma Induction: Impact on Repair Rather Than Formation of DNA Damage? *Photochem Photobiol*. 2020 Sep;96(5):962–72.
6. Obrador E, Liu-Smith F, Dellinger RW, Salvador R, Meyskens FL, Estrela JM. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. *Biol Chem*. 2019 Apr 24;400(5):589–612.
7. Khan AQ, Travers JB, Kemp MG. Roles of UVA Radiation and DNA Damage Responses in Melanoma Pathogenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2018 Jun;59(5):438–60.
8. Trucco LD, Mundra PA, Hogan K, Garcia-Martinez P, Viros A, Mandal AK, et al. Ultraviolet radiation-induced DNA damage is prognostic for outcome in melanoma. *Nat Med*. 2019 Feb;25(2):221–4.
9. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res*. 2003 Jun;16(3):297–306.
10. Hawkes JE, Truong A, Meyer LJ. Genetic predisposition to melanoma. *Semin Oncol*. 2016 Oct;43(5):591–7.
11. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*. 2003 Dec;139(12):1620–4; discussion 1624.
12. 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 Jan 1;41(1):28–44.
13. Goldstein AM, Tucker MA. Genetic Epidemiology of Cutaneous Melanoma: A Global Perspective. *Arch Dermatol*. 2001 Nov 1;137(11):1493–6.
14. Leachman SA, Lucero OM, Sampson JE, Cassidy P, Bruno W, Queirolo P, et al. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Mar;36(1):77–90.
15. Sargen MR, Merrill SL, Chu EY, Nathanson KL. CDKN2A mutations with p14 loss predisposing to multiple nerve sheath tumours, melanoma, dysplastic naevi and

- internal malignancies: a case series and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2016 Oct;175(4):785–9.
16. Soura E, Eliades P, Shannon K, Stratigos A, Tsao H. Hereditary Melanoma: Update on Syndromes and Management - Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Mar;74(3):395–407.
 17. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet*. 1996 Jan;12(1):97–9.
 18. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018 Aug;18(8):775–84.
 19. Bartlett EK, Karakousis GC. Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 Apr;24(2):215–27.
 20. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970 Nov;172(5):902–8.
 21. Balch CM, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Halpern NB, Maddox WA. A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg*. 1978 Dec;188(6):732–42.
 22. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Nov;67(6):472–92.
 23. Tejera-Vaquerizo A, Solís-García E, Ríos-Martín JJ, Moreno-Ramírez D. Primary Cutaneous Melanoma: Prognostic Factors Not Included in the Classification of the American Joint Committee on Cancer. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2011 May 1;102(4):255–63.
 24. Eigentler TK, Buettner PG, Leiter U, Garbe C. Impact of Ulceration in Stages I to III Cutaneous Melanoma As Staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: An Analysis of the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Clin Oncol*. 2004 Nov;22(21):4376–83.
 25. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3622–34.
 26. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2006 Feb;19 Suppl 2:S71-87.
 27. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Survival differences between patients with scalp or neck melanoma and those with melanoma of other sites in the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Arch Dermatol*. 2008 Apr;144(4):515–21.

28. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969 Mar;29(3):705–27.
29. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer.* 2003 Mar 15;97(6):1488–98.
30. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic Significance of Mitotic Rate in Localized Primary Cutaneous Melanoma: An Analysis of Patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 1;29(16):2199–205.
31. Antohe M, Nedelcu RI, Nichita L, Popp CG, Cioplea M, Brinzea A, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution. *Oncol Lett.* 2019 May;17(5):4155–61.
32. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Mar 1;25(7):869–75.
33. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S jaw, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 20;27(36):6199–206.
34. Xu J, Zhao J, Wang J, Sun C, Zhu X. Prognostic value of lactate dehydrogenase for melanoma patients receiving anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Medicine (Baltimore).* 2021 Apr 9;100(14):e25318.
35. Weiss SA, Han J, Darvishian F, Tchack J, Han SW, Malecek K, et al. Impact of aging on host immune response and survival in melanoma: an analysis of 3 patient cohorts. *J Transl Med.* 2016 Oct 19;14(1):299.
36. Chao C, Martin RCG, Ross MI, Reintgen DS, Edwards MJ, Noyes RD, et al. Correlation between prognostic factors and increasing age in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2004 Mar;11(3):259–64.
37. Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d’Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer.* 1995 May 15;75(10):2484–91.
38. Lindholm C, Andersson R, Dufmats M, Hansson J, Ingvar C, Möller T, et al. Invasive cutaneous malignant melanoma in Sweden, 1990-1999. A prospective, population-based study of survival and prognostic factors. *Cancer.* 2004 Nov 1;101(9):2067–78.
39. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1239–46.
40. Ny L, Hernberg M, Nyakas M, Koivunen J, Oddershede L, Yoon M, et al. BRAF mutational status as a prognostic marker for survival in malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2020 Jul 2;59(7):833–44.

41. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2135–47.
42. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008 Jun 3;5(6):e120.
43. Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Khosravi S, Martinka M, Ho V, Li G. Disease progression and patient survival are significantly influenced by BRAF protein expression in primary melanoma. *Br J Dermatol*. 2013 Aug;169(2):320–8.
44. Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Aug;24(4):666–72.
45. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *OncoTargets Ther*. 2017 Aug 8;10:3941–7.
46. Vizoso M, Ferreira HJ, Lopez-Serra P, Carmona FJ, Martínez-Cardús A, Girotti MR, et al. Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):741–50.
47. Wouters J, Vizoso M, Martinez-Cardus A, Carmona FJ, Govaere O, Laguna T, et al. Comprehensive DNA methylation study identifies novel progression-related and prognostic markers for cutaneous melanoma. *BMC Med*. 2017 Jun 5;15(1):101.
48. Loras A, Gil-Barrachina M, Marqués-Torrejón MÁ, Perez-Pastor G, Martinez-Cadenas C. UV-Induced Somatic Mutations Driving Clonal Evolution in Healthy Skin, Nevus, and Cutaneous Melanoma. *Life Basel Switz*. 2022 Aug 29;12(9):1339.
49. Pagliuca C, Di Leo L, De Zio D. New Insights into the Phenotype Switching of Melanoma. *Cancers*. 2022 Dec 12;14(24):6118.
50. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018 Jan;34(1):13–24.
51. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK Pathway in Melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 1;80(5):624–37.
52. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1681–96.
53. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):251–63.
54. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jun;16(6):345–58.
55. Bastian BC. The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9(1):239–71.
56. Ferrara G, Argenziano G. The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic Neoplasms: Suggestions From Routine Practice. *Front Oncol*. 2021;11:675296.

57. Martinez-Cardús A, Vizoso M, Moran S, Manzano JL. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. *Ann Transl Med*. 2015 Sep;3(15):209.
58. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond Engl*. 2016 Apr;387(10026):1415–26.
59. Kure S, Ishino K, Kudo M, Wada R, Saito M, Nagaoka R, et al. Incidence of BRAF V600E mutation in patients with papillary thyroid carcinoma: a single-institution experience. *J Int Med Res*. 2019 Nov;47(11):5560–72.
60. Jakob JA, Bassett RL, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2012 Aug 15;118(16):4014–23.
61. Randic T, Kozar I, Margue C, Utikal J, Kreis S. NRAS mutant melanoma: Towards better therapies. *Cancer Treat Rev*. 2021 Sep;99:102238.
62. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KSM. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013 Jun 20;32(25):3009–18.
63. Yin C, Zhu B, Zhang T, Liu T, Chen S, Liu Y, et al. Pharmacological Targeting of STK19 Inhibits Oncogenic NRAS-Driven Melanomagenesis. *Cell*. 2019 Feb 21;176(5):1113-1127.e16.
64. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet*. 2015 Sep;47(9):996–1002.
65. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating Distinct Roles for NF1 in Melanomagenesis. *Cancer Discov*. 2013 Mar 7;3(3):338–49.
66. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res*. 2014 Apr;74(8):2340–50.
67. Rajkumar S, Watson IR. Molecular characterisation of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *Br J Cancer*. 2016 Jul 12;115(2):145–55.
68. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6821–8.
69. Handolias D, Salemi R, Murray W, Tan A, Liu W, Viros A, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Apr;23(2):210–5.
70. Helgadottir H, Höiom V, Tuominen R, Nielsen K, Jönsson G, Olsson H, et al. Germline CDKN2A Mutation Status and Survival in Familial Melanoma Cases. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2016 Nov 1;108(11):djw135.

71. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2003 Jun 1;63(11):2881–90.
72. Gandini S, Zanna I, De Angelis S, Palli D, Raimondi S, Ribero S, et al. TERT promoter mutations and melanoma survival: A comprehensive literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021 Apr 1;160:103288.
73. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):959–61.
74. Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert MD, Denat L, et al. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature.* 2005 Feb;433(7027):764–9.
75. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005 Jul;436(7047):117–22.
76. Cheli Y, Guiliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, Hofman P, et al. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene.* 2011 May;30(20):2307–18.
77. Gelmi MC, Houtzagers LE, Strub T, Krossa I, Jager MJ. MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. *Int J Mol Sci.* 2022 May 26;23(11):6001.
78. Tudrej KB, Czepielewska E, Kozłowska-Wojciechowska M. SOX10-MITF pathway activity in melanoma cells. *Arch Med Sci AMS.* 2017 Oct;13(6):1493–503.
79. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* 2006 Dec 15;20(24):3426–39.
80. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Dec;23(6):746–59.
81. Seberg HE, Van Otterloo E, Cornell RA. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017 Sep;30(5):454–66.
82. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2014 Nov 30;72(7):1249–60.
83. Gosman LM, Țăpoi DA, Costache M. Cutaneous Melanoma: A Review of Multifactorial Pathogenesis, Immunohistochemistry, and Emerging Biomarkers for Early Detection and Management. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan;24(21):15881.
84. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019 Nov 2;20(11):1366–79.
85. Stages of Melanoma Skin Cancer [Internet]. [cited 2023 Oct 16]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html>

86. Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011 Jan;20(1):1–17.
87. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*. 2011;5(2):124–36.
88. Majem M, Manzano JL, Marquez-Rodas I, Mujika K, Muñoz-Couselo E, Pérez-Ruiz E, et al. SEOM clinical guideline for the management of cutaneous melanoma (2020). *Clin Transl Oncol*. 2021 May;23(5):948–60.
89. Meng D, Carvajal RD. KIT as an Oncogenic Driver in Melanoma: An Update on Clinical Development. *Am J Clin Dermatol*. 2019 Jun;20(3):315–23.
90. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS, Tao A, Torres NM, Chang MT, et al. Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature*. 2017 Aug;548(7666):234–8.
91. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Aug;14(8):463–82.
92. Huncharek M, Caubet JF, McGarry R. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. *Melanoma Res*. 2001 Feb;11(1):75–81.
93. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Mar 15;22(6):1118–25.
94. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):158–66.
95. Quirt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *The Oncologist*. 2007 Sep;12(9):1114–23.
96. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol*. 2013;31(3):290–7.
97. Atkins MB, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Jul;17(7):2105–16.
98. Zeng H, Liu F, Zhou H, Zeng C. Individualized Treatment Strategy for Cutaneous Melanoma: Where Are We Now and Where Are We Going? *Front Oncol*. 2021;11:775100.
99. Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2019 Apr 1;1871(2):313–22.

100. Kasakovski D, Skrygan M, Gambichler T, Susok L. Advances in Targeting Cutaneous Melanoma. *Cancers*. 2021 Apr 26;13(9):2090.
101. Shevtsov M, Kaesler S, Posch C, Multhoff G, Biedermann T. Magnetic nanoparticles in theranostics of malignant melanoma. *EJNMMI Res*. 2021 Dec 14;11:127.
102. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. Vol. 10, *Journal of translational medicine*. 2012. p. 85.
103. 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 Jun 30;364(26):2507–16.
104. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2012 Jul 28;380(9839):358–65.
105. 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 May;19(5):603–15.
106. Liskay G, Gogas H, Mandalà M, Arance Fernandez AM, Garbe C, Schadendorf D, et al. Update on overall survival in COLUMBUS: A randomized phase III trial of encorafenib (ENCO) plus binimetinib (BINI) versus vemurafenib (VEM) or ENCO in patients with BRAF V600-mutant melanoma. *J Clin Oncol*. 2019 May 20;37(15_suppl):9512–9512.
107. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012 Feb 23;366(8):707–14.
108. Paraiso KHT, Fedorenko IV, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer*. 2010 Jun 8;102(12):1724–30.
109. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2016 Jan;8(1):48–56.
110. King AJ, Arnone MR, Bleam MR, Moss KG, Yang J, Fedorowicz KE, et al. Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS One*. 2013;8(7):e67583.
111. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA, et al. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Feb 1;31(4):482–9.

112. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2012 Jul 12;367(2):107–14.
113. Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM. Clinical Development of BRAF plus MEK Inhibitor Combinations. *Trends Cancer*. 2020 Sep 1;6(9):797–810.
114. Chapman PB, Solit DB, Rosen N. Combination of RAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated melanoma: feedback is not encouraged. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):603–4.
115. Hoffner B, Benchich K. Trametinib: A Targeted Therapy in Metastatic Melanoma. *J Adv Pract Oncol*. 2018;9(7):741–5.
116. Tran B, Cohen MS. The Discovery and Development of Binimetinib for the Treatment of Melanoma. *Expert Opin Drug Discov*. 2020 Jul;15(7):745–54.
117. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Sep;17(9):1248–60.
118. Sabbatino F, Liguori L, Pepe S, Ferrone S. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of melanoma. *Expert Opin Biol Ther*. 2022 May 4;22(5):563–76.
119. Littman DR. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2015 Sep 10;162(6):1186–90.
120. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252–64.
121. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):116–26.
122. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1972–5.
123. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
124. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Sep 24;373(13):1270–1.
125. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2019 Oct 17;381(16):1535–46.
126. 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 Oct 2;192(7):1027–34.

127. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887–95.
128. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677–704.
129. Steininger J, Gellrich FF, Schulz A, Westphal D, Beissert S, Meier F. Systemic Therapy of Metastatic Melanoma: On the Road to Cure. *Cancers.* 2021 Jan;13(6):1430.
130. Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2019 Sep;20(9):1239–51.
131. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):320–30.
132. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med.* 2017 Jun 8;376(23):2211–22.
133. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jun 1;17(6):757–67.
134. Michielin O, Akkooi ACJ van, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †. *Ann Oncol.* 2019 Dec 1;30(12):1884–901.
135. Blank CU, Rozeman EA, Fanchi LF, Sikorska K, van de Wiel B, Kvistborg P, et al. Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat Med.* 2018 Nov;24(11):1655–61.
136. Reijers ILM, Menzies AM, van Akkooi ACJ, Versluis JM, van den Heuvel NMJ, Saw RPM, et al. Personalized response-directed surgery and adjuvant therapy after neoadjuvant ipilimumab and nivolumab in high-risk stage III melanoma: the PRADO trial. *Nat Med.* 2022 Jun;28(6):1178–88.
137. Rozeman EA, Menzies AM, van Akkooi ACJ, Adhikari C, Bierman C, van de Wiel BA, et al. Identification of the optimal combination dosing schedule of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma (OpACIN-neo): a multicentre, phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 2019 Jul;20(7):948–60.
138. Patel SP, Othus M, Chen Y, Wright GP, Yost KJ, Hyngstrom JR, et al. Neoadjuvant-Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2023 Mar 2;388(9):813–23.
139. Lucas MW, Lijnsvelt J, Pulleman S, Scolyer RA, Menzies AM, Van Akkooi ACJ, et al. The NADINA trial: A multicenter, randomised, phase 3 trial comparing the efficacy of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab with standard adjuvant

- nivolumab in macroscopic resectable stage III melanoma. *J Clin Oncol*. 2022 Jun;40(16_suppl):TPS9605–TPS9605.
140. Long GV, Saw RPM, Lo S, Nieweg OE, Shannon KF, Gonzalez M, et al. Neoadjuvant dabrafenib combined with trametinib for resectable, stage IIIB-C, BRAFV600 mutation-positive melanoma (NeoCombi): a single-arm, open-label, single-centre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019 Jul;20(7):961–71.
 141. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol*. 2018 Aug 1;25(8):2105–10.
 142. Dummer R, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Kirkwood JM, et al. Five-Year Analysis of Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III Melanoma. *N Engl J Med*. 2020 Sep 17;383(12):1139–48.
 143. Hauschild A, Dummer R, Schadendorf D, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, et al. Longer Follow-Up Confirms Relapse-Free Survival Benefit With Adjuvant Dabrafenib Plus Trametinib in Patients With Resected BRAF V600-Mutant Stage III Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018 Dec 10;36(35):3441–9.
 144. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9;377(19):1813–23.
 145. Maio M, Lewis K, Demidov L, Mandalà M, Bondarenko I, Ascierto PA, et al. Adjuvant vemurafenib in resected, BRAFV600 mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Apr;19(4):510–20.
 146. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1845–55.
 147. Ascierto PA, Vecchio MD, Mandalá M, Gogas H, Arance AM, Dalle S, et al. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage IIIB–C and stage IV melanoma (CheckMate 238): 4-year results from a multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Nov 1;21(11):1465–77.
 148. Larkin J, Del Vecchio M, Mandalá M, Gogas H, Arance Fernandez AM, Dalle S, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III/IV Melanoma: 5-Year Efficacy and Biomarker Results from CheckMate 238. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2023 Sep 1;29(17):3352–61.
 149. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9;377(19):1824–35.
 150. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med*. 2018 May 10;378(19):1789–801.
 151. Eggermont AMM, Blank CU, Mandalà M, Long GV, Atkinson VG, Dalle S, et al. Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma (EORTC

- 1325-MG/KEYNOTE-054): distant metastasis-free survival results from a double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021 May;22(5):643–54.
152. Kirkwood JM, Del Vecchio M, Weber J, Hoeller C, Grob JJ, Mohr P, et al. Adjuvant nivolumab in resected stage IIB/C melanoma: primary results from the randomized, phase 3 CheckMate 76K trial. *Nat Med.* 2023 Nov;29(11):2835–43.
153. Luke JJ, Rutkowski P, Queirolo P, Del Vecchio M, Mackiewicz J, Chiarion-Sileni V, et al. Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy in completely resected stage IIB or IIC melanoma (KEYNOTE-716): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 2022 Apr 30;399(10336):1718–29.
154. Lee R, Mandala M, Long GV, Eggermont AMM, van Akkooi ACJ, Sandhu S, et al. Adjuvant therapy for stage II melanoma: the need for further studies. *Eur J Cancer.* 2023 Aug 1;189:112914.
155. Ascierto PA, Del Vecchio M, Robert C, Mackiewicz A, Chiarion-Sileni V, Arance A, et al. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017 May;18(5):611–22.
156. 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 Jun 30;364(26):2517–26.
157. Ascierto PA, Long GV, Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, et al. Survival Outcomes in Patients With Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated With Nivolumab Therapy. *JAMA Oncol.* 2019 Feb;5(2):187–94.
158. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet Lond Engl.* 2017 Oct 21;390(10105):1853–62.
159. 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 Jan 1;372(1):30–9.
160. Espinosa E, Márquez-Rodas I, Soria A, Berrocal A, Manzano JL, Gonzalez-Cao M, et al. Predictive factors of response to immunotherapy-a review from the Spanish Melanoma Group (GEM). *Ann Transl Med.* 2017 Oct;5(19):389.
161. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2019 Aug 15;381(7):626–36.
162. Ascierto PA, Dréno B, Larkin J, Ribas A, Liskay G, Maio M, et al. 5-Year Outcomes with Cobimetinib plus Vemurafenib in BRAFV600 Mutation-Positive Advanced Melanoma: Extended Follow-up of the coBRIM Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2021 Oct 1;27(19):5225–35.
163. Tétu P, Baroudjian B, Lebbe C. Targeting BRAF and MEK inhibitors in melanoma in the metastatic, neoadjuvant and adjuvant setting. *Curr Opin Oncol.* 2020 Mar;32(2):85.

164. Ascierto PA, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, et al. Overall survival with first-line atezolizumab in combination with vemurafenib and cobimetinib in BRAFV600 mutation-positive advanced melanoma (IMspire150): second interim analysis of a multicentre, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2023 Jan;24(1):33–44.
165. Gutzmer R, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, et al. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2020 Jun 13;395(10240):1835–44.
166. Gogas H, Dréno B, Larkin J, Demidov L, Stroyakovskiy D, Eroglu Z, et al. Cobimetinib plus atezolizumab in BRAFV600 wild-type melanoma: primary results from the randomized phase III IMspire170 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 Mar;32(3):384–94.
167. Dummer R, Long GV, Robert C, Tawbi HA, Flaherty KT, Ascierto PA, et al. Randomized Phase III Trial Evaluating Spartalizumab Plus Dabrafenib and Trametinib for BRAF V600-Mutant Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2022 May 1;40(13):1428–38.
168. Nathan P, Dummer R, Long GV, Ascierto PA, Tawbi HA, Robert C, et al. LBA43 Spartalizumab plus dabrafenib and trametinib (Sparta-DabTram) in patients (pts) with previously untreated BRAF V600-mutant unresectable or metastatic melanoma: Results from the randomized part 3 of the phase III COMBI-i trial. *Ann Oncol*. 2020 Sep 1;31:S1172.
169. Ascierto PA, Mandalà M, Ferrucci PF, Guidoboni M, Rutkowski P, Ferraresi V, et al. Sequencing of Ipilimumab Plus Nivolumab and Encorafenib Plus Binimetinib for Untreated BRAF-Mutated Metastatic Melanoma (SECOMBIT): A Randomized, Three-Arm, Open-Label Phase II Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2023 Jan 10;41(2):212–21.
170. Ascierto PA, Casula M, Bulgarelli J, Pisano M, Piccinini C, Piccin L, et al. Sequential immunotherapy and targeted therapy for metastatic BRAF V600 mutated melanoma: 4-year survival and biomarkers evaluation from the phase II SECOMBIT trial. *Nat Commun*. 2024 Jan 2;15(1):146.
171. Atkins MB, Lee SJ, Chmielowski B, Tarhini AA, Cohen GI, Truong TG, et al. Combination Dabrafenib and Trametinib Versus Combination Nivolumab and Ipilimumab for Patients With Advanced BRAF-Mutant Melanoma: The DREAMseq Trial-ECOG-ACRIN EA6134. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2023 Jan 10;41(2):186–97.
172. Warburton L, Meniawy TM, Calapre L, Pereira M, McEvoy A, Ziman M, et al. Stopping targeted therapy for complete responders in advanced BRAF mutant melanoma. *Sci Rep*. 2020 Nov 2;10(1):18878.
173. Seth R, Agarwala SS, Messersmith H, Alluri KC, Ascierto PA, Atkins MB, et al. Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2023 Oct 20;41(30):4794–820.
174. Long GV, 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 Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Jul 1;28(7):1631–9.
175. 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 Nov 13;371(20):1867–76.
176. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*. 2021 Sep 5;10(9):2320.
177. Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol*. 2022 Oct 1;85:123–54.
178. Yao Z, Torres NM, Tao A, Gao Y, Luo L, Li Q, et al. BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell*. 2015 Sep;28(3):370–83.
179. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun;417(6892):949–54.
180. Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene*. 2018;37(24):3183–99.
181. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 May;29(15):2046–51.
182. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. 2020 Mar;19(3):1997–2007.
183. Park E, Rawson S, Li K, Kim BW, Ficarro SB, Pino GGD, et al. Architecture of autoinhibited and active BRAF–MEK1–14-3-3 complexes. *Nature*. 2019;575(7783):545–50.
184. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020;9(1).
185. Martinez Fiesco JA, Durrant DE, Morrison DK, Zhang P. Structural insights into the BRAF monomer-to-dimer transition mediated by RAS binding. *Nat Commun*. 2022;13(1):486.
186. Thevakumaran N, Lavoie H, Critton DA, Tebben A, Marinier A, Sicheri F, et al. Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(1):37–43.
187. Vijayan RSK, He P, Modi V, Duong-Ly KC, Ma H, Peterson JR, et al. Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J Med Chem*. 2015 Jan;58(1):466–79.
188. Zaman A, Wu W, Bivona TG. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. *Cancers*. 2019 Aug;11(8).
189. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation and

- primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*. 2017 Mar 1;73:85–92.
190. Hu X, Zhang Z. Understanding the Genetic Mechanisms of Cancer Drug Resistance Using Genomic Approaches. *Trends Genet*. 2016 Feb 1;32(2):127–37.
191. Marine JC, Dawson SJ, Dawson MA. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020 Dec;20(12):743–56.
192. Bell CC, Fennell KA, Chan YC, Rambow F, Yeung MM, Vassiliadis D, et al. Targeting enhancer switching overcomes non-genetic drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Nat Commun*. 2019 Jun 20;10(1):2723.
193. Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell*. 2015 Sep 10;162(6):1271–85.
194. Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*. 2017 Jun 15;546(7658):431–5.
195. Bell CC, Gilan O. Principles and mechanisms of non-genetic resistance in cancer. *Br J Cancer*. 2020 Feb;122(4):465–72.
196. Sharma A, Cao EY, Kumar V, Zhang X, Leong HS, Wong AML, et al. Longitudinal single-cell RNA sequencing of patient-derived primary cells reveals drug-induced infidelity in stem cell hierarchy. *Nat Commun*. 2018 Nov 22;9(1):4931.
197. Fedorenko IV, Paraiso KHT, Smalley KSM. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2011 Aug 1;82(3):201–9.
198. Amaria RN, Prieto PA, Tetzlaff MT, Reuben A, Andrews MC, Ross MI, et al. Neoadjuvant plus adjuvant dabrafenib and trametinib versus standard of care in patients with high-risk, surgically resectable melanoma: a single-centre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Feb;19(2):181–93.
199. Yu C, Liu X, Yang J, Zhang M, Jin H, Ma X, et al. Combination of Immunotherapy With Targeted Therapy: Theory and Practice in Metastatic Melanoma. *Front Immunol*. 2019 May 7;10:990.
200. Catalanotti F, Cheng DT, Shoushtari AN, Johnson DB, Panageas KS, Momtaz P, et al. PTEN Loss-of-Function Alterations Are Associated With Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitors in Metastatic Melanoma. *JCO Precis Oncol*. 2017;(1):1–15.
201. Paraiso KHT, Xiang Y, Rebecca VW, Abel E V, Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res*. 2011 Apr;71(7):2750–60.
202. Nathanson KL, Martin AM, Wubbenhorst B, Greshock J, Letrero R, D'Andrea K, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Sep;19(17):4868–78.

203. Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, Wagle N, Hsiao J, Cowley GS, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov.* 2013 Mar;3(3):350–62.
204. Smalley KSM, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* 2008 Sep;7(9):2876–83.
205. Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, Mahdavi M, Gutschner T, Genovese G, et al. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res.* 2014 Sep;74(17):4845–52.
206. Lionarons DA, Hancock DC, Rana S, East P, Moore C, Murillo MM, et al. RAC1(P29S) Induces a Mesenchymal Phenotypic Switch via Serum Response Factor to Promote Melanoma Development and Therapy Resistance. *Cancer Cell.* 2019 Jul;36(1):68-83.e9.
207. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012 Sep;44(9):1006–14.
208. Carlino MS, Fung C, Shahheydari H, Todd JR, Boyd SC, Irvine M, et al. Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015 Jan 1;21(1):98–105.
209. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *J Clin Oncol.* 2011 Aug 1;29(22):3085–96.
210. Saei A, Palafox M, Benoukraf T, Kumari N, Jaynes PW, Iyengar PV, et al. Loss of USP28-mediated BRAF degradation drives resistance to RAF cancer therapies. *J Exp Med.* 2018 Jul;215(7):1913–28.
211. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature.* 2012 Jul;487(7408):500–4.
212. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012 Jul;487(7408):505–9.
213. Caenepeel S, Cooke K, Wadsworth S, Huang G, Robert L, Moreno BH, et al. MAPK pathway inhibition induces MET and GAB1 levels, priming BRAF mutant melanoma for rescue by hepatocyte growth factor. *Oncotarget.* 2017 Mar;8(11):17795–809.
214. Qin Y, Roszik J, Chattopadhyay C, Hashimoto Y, Liu C, Cooper ZA, et al. Hypoxia-Driven Mechanism of Vemurafenib Resistance in Melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2016 Oct;15(10):2442–54.
215. Widmer DS, Hoek KS, Cheng PF, Eichhoff OM, Biedermann T, Raaijmakers MIG, et al. Hypoxia contributes to melanoma heterogeneity by triggering HIF1 α -dependent phenotype switching. *J Invest Dermatol.* 2013 Oct;133(10):2436–43.

216. Emmons MF, Faião-Flores F, Smalley KSM. The role of phenotypic plasticity in the escape of cancer cells from targeted therapy. *Biochem Pharmacol.* 2016 Dec 15;122:1–9.
217. Marin-Bejar O, Rogiers A, Dewaele M, Femel J, Karras P, Pozniak J, et al. Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell.* 2021 Aug;39(8):1135-1149.e8.
218. Patel RP, Somasundram PM, Smith LK, Sheppard KE, McArthur GA. The therapeutic potential of targeting minimal residual disease in melanoma. *Clin Transl Med.* 2023 Mar;13(3):e1197.
219. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):69–80.
220. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature.* 2017 Nov 9;551(7679):247–50.
221. Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, et al. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene.* 2015 Aug;34(34):4448–59.
222. Chisholm RH, Lorenzi T, Lorz A, Larsen AK, Almeida LN de, Escargueil A, et al. Emergence of Drug Tolerance in Cancer Cell Populations: An Evolutionary Outcome of Selection, Nongenetic Instability, and Stress-Induced Adaptation. *Cancer Res.* 2015 Mar 12;75(6):930–9.
223. Fallahi-Sichani M, Becker V, Izar B, Baker GJ, Lin JR, Boswell SA, et al. Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol.* 2017 Jan 9;13(1):905.
224. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJJE, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature.* 2014;508(7494):118–22.
225. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med.* 2016 Mar;22(3):262–9.
226. Falletta P, Sanchez-del-Campo L, Chauhan J, Efferm M, Kenyon A, Kershaw CJ, et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev.* 2017 Jan 1;31(1):18–33.
227. Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* 2006 Aug;19(4):290–302.
228. Ho YJ, Anaparthi N, Molik D, Mathew G, Aicher T, Patel A, et al. Single-cell RNA-seq analysis identifies markers of resistance to targeted BRAF inhibitors in melanoma cell populations. *Genome Res.* 2018 Sep;28(9):1353–63.

229. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016 Apr 8;352(6282):189–96.
230. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, et al. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell*. 2018 May 14;33(5):890-904.e5.
231. Wouters J, Kalender-Atak Z, Minnoye L, Spanier KI, De Waegeneer M, Bravo González-Blas C, et al. Robust gene expression programs underlie recurrent cell states and phenotype switching in melanoma. *Nat Cell Biol*. 2020 Aug;22(8):986–98.
232. Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, et al. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell*. 2018 Aug 9;174(4):843-855.e19.
233. Rambow F, Marine JC, Goding CR. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev*. 2019 Oct 1;33(19–20):1295–318.
234. Baron M, Tagore M, Hunter MV, Kim IS, Moncada R, Yan Y, et al. The Stress-Like Cancer Cell State Is a Consistent Component of Tumorigenesis. *Cell Syst*. 2020 Nov 18;11(5):536-546.e7.
235. Aloia A, Müllhaupt D, Chabbert CD, Eberhart T, Flückiger-Mangual S, Vukolic A, et al. A Fatty Acid Oxidation-dependent Metabolic Shift Regulates the Adaptation of BRAF-mutated Melanoma to MAPK Inhibitors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Nov 15;25(22):6852–67.
236. Su Y, Wei W, Robert L, Xue M, Tsoi J, Garcia-Diaz A, et al. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 Dec 26;114(52):13679–84.
237. Smith MP, Brunton H, Rowling EJ, Ferguson J, Arozarena I, Miskolczi Z, et al. Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer Cell*. 2016 Mar 14;29(3):270–84.
238. Smith MP, Wellbrock C. Molecular Pathways: Maintaining MAPK Inhibitor Sensitivity by Targeting Nonmutational Tolerance. *Clin Cancer Res*. 2016 Dec 15;22(24):5966–70.
239. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):650–6.
240. Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun*. 2015 Apr 9;6(1):6683.
241. Huang F, Santinon F, Flores González RE, del Rincón SV. Melanoma Plasticity: Promoter of Metastasis and Resistance to Therapy. *Front Oncol*. 2021 Sep 16;11:756001.

242. Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* 2014 Jan;4(1):80–93.
243. Griffin M, Scotto D, Josephs DH, Mele S, Crescioli S, Bax HJ, et al. BRAF inhibitors: resistance and the promise of combination treatments for melanoma. *Oncotarget.* 2017 Aug 3;8(44):78174–92.
244. Corcoran RB, Settleman J, Engelman JA. Potential therapeutic strategies to overcome acquired resistance to BRAF or MEK inhibitors in BRAF mutant cancers. *Oncotarget.* 2011 Apr;2(4):336–46.
245. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010 Dec;468(7326):973–7.
246. Romano E, Pradervand S, Paillusson A, Weber J, Harshman K, Muehlethaler K, et al. Identification of multiple mechanisms of resistance to vemurafenib in a patient with BRAFV600E-mutated cutaneous melanoma successfully rechallenged after progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013 Oct;19(20):5749–57.
247. Wagle N, Van Allen EM, Treacy DJ, Frederick DT, Cooper ZA, Taylor-Weiner A, et al. MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition. *Cancer Discov.* 2014 Jan;4(1):61–8.
248. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature.* 2011 Nov;480(7377):387–90.
249. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature.* 2012;483(7387):100–3.
250. Atefi M, von Euw E, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, et al. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. *PloS One.* 2011/12/14 ed. 2011;6(12):e28973–e28973.
251. Irvine M, Stewart A, Pedersen B, Boyd S, Kefford R, Rizos H. Oncogenic PI3K/AKT promotes the step-wise evolution of combination BRAF/MEK inhibitor resistance in melanoma. *Oncogenesis.* 2018;7(9):72.
252. Tran KB, Kolekar S, Javed A, Jaynes P, Shih JH, Wang Q, et al. Diverse mechanisms activate the PI 3-kinase/mTOR pathway in melanomas: implications for the use of PI 3-kinase inhibitors to overcome resistance to inhibitors of BRAF and MEK. *BMC Cancer.* 2021 Feb 6;21(1):136.
253. Wang B, Zhang W, Zhang G, Kwong L, Lu H, Tan J, et al. Targeting mTOR signaling overcomes acquired resistance to combined BRAF and MEK inhibition in BRAF-mutant melanoma. *Oncogene.* 2021 Sep;40(37):5590–9.
254. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature.* 2010 Dec 16;468(7326):968–72.

255. Shen CH, Kim SH, Trousil S, Frederick DT, Piris A, Yuan P, et al. Loss of cohesin complex components STAG2 or STAG3 confers resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Nat Med.* 2016;22(9):1056–61.
256. Gupta R, Bugide S, Wang B, Green MR, Johnson DB, Wajapeyee N. Loss of BOP1 confers resistance to BRAF kinase inhibitors in melanoma by activating MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(10):4583–91.
257. Lee B, Sahoo A, Sawada J, Marchica J, Sahoo S, Layng FIAL, et al. MicroRNA-211 Modulates the DUSP6-ERK5 Signaling Axis to Promote BRAF(V600E)-Driven Melanoma Growth In Vivo and BRAF/MEK Inhibitor Resistance. *J Invest Dermatol.* 2021 Feb;141(2):385–94.
258. Singh MK, Altameemi S, Lares M, Newton MA, Setaluri V. Role of dual specificity phosphatases (DUSPs) in melanoma cellular plasticity and drug resistance. *Sci Rep.* 2022 Aug 23;12(1):14395.
259. Bellmann L, Cappellano G, Schachtl-Riess JF, Prokopi A, Seretis A, Ortner D, et al. A TLR7 agonist strengthens T and NK cell function during BRAF-targeted therapy in a preclinical melanoma model. *Int J Cancer.* 2020;146(5):1409–20.
260. Song C, Piva M, Sun L, Hong A, Moriceau G, Kong X, et al. Recurrent Tumor Cell–Intrinsic and –Extrinsic Alterations during MAPKi-Induced Melanoma Regression and Early Adaptation. *Cancer Discov.* 2017 Nov 1;7(11):1248–65.
261. Steinberg SM, Shabaneh TB, Zhang P, Martyanov V, Li Z, Malik BT, et al. Myeloid Cells That Impair Immunotherapy Are Restored in Melanomas with Acquired Resistance to BRAF Inhibitors. *Cancer Res.* 2017 Apr 1;77(7):1599–610.
262. Jazirehi AR, Nazarian R, Torres-Collado AX, Economou JS. Aberrant apoptotic machinery confers melanoma dual resistance to BRAF(V600E) inhibitor and immune effector cells: immunosensitization by a histone deacetylase inhibitor. *Am J Clin Exp Immunol.* 2014;3(1):43–56.
263. Pieper N, Zaremba A, Leonardelli S, Harbers FN, Schwamborn M, Lübcke S, et al. Evolution of melanoma cross-resistance to CD8+ T cells and MAPK inhibition in the course of BRAFi treatment. *Oncoimmunology.* 2018;7(8):e1450127.
264. Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJL, Robert L, Foulad D, et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014 Jul 1;20(13):3446–57.
265. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013 Feb 1;19(3):598–609.
266. Kim MH, Kim CG, Kim SK, Shin SJ, Choe EA, Park SH, et al. YAP-Induced PD-L1 Expression Drives Immune Evasion in BRAFi-Resistant Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2018 Mar;6(3):255–66.
267. Górniak P, Wasylecka-Juszczynska M, Ługowska I, Rutkowski P, Polak A, Szydłowski M, et al. BRAF inhibition curtails IFN-gamma-inducible PD-L1 expression and upregulates the immunoregulatory protein galectin-1 in melanoma cells. *Mol Oncol.* 2020 Aug;14(8):1817–32.

268. Liu F, Jiang CC, Yan XG, Tseng HY, Wang CY, Zhang YY, et al. BRAF/MEK inhibitors promote CD47 expression that is reversible by ERK inhibition in melanoma. *Oncotarget*. 2017 Sep 19;8(41):69477–92.
269. Wang T, Xiao M, Ge Y, Krepler C, Belser E, Lopez-Coral A, et al. BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Apr 1;21(7):1652–64.
270. Wang S, Wang J, Chen Z, Luo J, Guo W, Sun L, et al. Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. *Npj Precis Oncol*. 2024 Feb 10;8(1):1–19.
271. Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jan;20(1):25–39.
272. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):124–8.
273. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*. 2017 Dec 21;377(25):2500–1.
274. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. 2017 Jul;547(7662):217–21.
275. Johnson DB, Estrada MV, Salgado R, Sanchez V, Doxie DB, Opalenik SR, et al. Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun*. 2016 Jan 29;7:10582.
276. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, Gjini E, Giobbie-Hurder A, Jin C, et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med*. 2018 Jul 18;10(450):eaar3342.
277. Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Hyman J, et al. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun*. 2014 Dec 2;5(1):5694.
278. Pozniak J, Pedri D, Landeloos E, Herck YV, Antoranz A, Karras P, et al. A TCF4/BRD4-dependent regulatory network confers cross-resistance to targeted and immune checkpoint therapy in melanoma. *bioRxiv*. 2022 Jan 1;2022.08.11.502598.
279. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7):e0232565.
280. Lin YW, Wen YC, Hsiao CH, Lai FR, Yang SF, Yang YC, et al. Proteoglycan SPOCK1 as a Poor Prognostic Marker Promotes Malignant Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Triggering the Snail/Slug-MMP-2 Axis-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cells*. 2023 Jan 17;12(3):352.
281. Liu Y, Han T, Wu J, Zhou J, Guo J, Miao R, et al. SPOCK1, as a potential prognostic and therapeutic biomarker for lung adenocarcinoma, is associated with epithelial-

- mesenchymal transition and immune evasion. *J Transl Med.* 2023 Dec 12;21(1):909.
282. Váncza L, Horváth A, Seungyeon L, Rókusz A, Dezső K, Reszegi A, et al. SPOCK1 Overexpression Suggests Poor Prognosis of Ovarian Cancer. *Cancers.* 2023 Mar 29;15(7):2037.
283. Váncza L, Karászi K, Péterfia B, Turiák L, Dezső K, Sebestyén A, et al. SPOCK1 Promotes the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2022;12:819883.
284. Xu M, Zhang X, Zhang S, Piao J, Yang Y, Wang X, et al. SPOCK1/SIX1 axis promotes breast cancer progression by activating AKT/mTOR signaling. *Aging.* 2020 Dec 3;13(1):1032–50.
285. Chen D, Zhou H, Liu G, Zhao Y, Cao G, Liu Q. SPOCK1 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer through Slug-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb;22(2):797–807.
286. Liu HX, Cao YY, Qu JY. SPOCK1 promotes the proliferation and migration of colon cancer cells by regulating the NF- κ B pathway and inducing EMT. *Neoplasma.* 2021 Jul;68(4):702–10.
287. Chien MH, Lin YW, Wen YC, Yang YC, Hsiao M, Chang JL, et al. Targeting the SPOCK1-snail/slug axis-mediated epithelial-to-mesenchymal transition by apigenin contributes to repression of prostate cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jun 10;38(1):246.
288. Miao L, Wang Y, Xia H, Yao C, Cai H, Song Y. SPOCK1 is a novel transforming growth factor- β target gene that regulates lung cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 1;440(4):792–7.
289. Sun L rui, Li S yu, Guo Q shi, Zhou W, Zhang H mei. SPOCK1 Involvement in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: A New Target in Cancer Therapy? *Cancer Manag Res.* 2020 May 18;12:3561–9.
290. Ye Z, Chen J, Hu X, Yang S, Xuan Z, Lu X, et al. SPOCK1: a multi-domain proteoglycan at the crossroads of extracellular matrix remodeling and cancer development. *Am J Cancer Res.* 2020 Oct 1;10(10):3127–37.
291. SCoPe [Internet]. [cited 2024 Mar 19]. Available from: https://scope.aertslab.org/#/64d2a9e4-b120-475e-b9b9-2c020c39f378/*/welcome
292. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014 Jan;4(1):94–109.
293. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):673–87.
294. Nguyen BA, Ho J, De La Cruz Diaz JS, Nishimura S, Kaplan DH. TGF β activating integrins β 6 and β 8 are dysregulated in inflammatory skin disease and cutaneous melanoma. *J Dermatol Sci.* 2022 Apr 1;106(1):2–11.
295. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):924–40.

296. Lainé A, Labiad O, Hernandez-Vargas H, This S, Sanlaville A, Léon S, et al. Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ -mediated TGF- β activation. *Nat Commun.* 2021 Oct 28;12(1):6228.
297. Semple F, Dorin JR. β -Defensins: Multifunctional Modulators of Infection, Inflammation and More? *J Innate Immun.* 2012 Jun;4(4):337–48.
298. Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonecchi R. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:379.
299. Rizeq B, Malki MI. The Role of CCL21/CCR7 Chemokine Axis in Breast Cancer Progression. *Cancers.* 2020 Apr;12(4):1036.
300. Sharma S, Stolina M, Luo J, Strieter RM, Burdick M, Zhu LX, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000 May 1;164(9):4558–63.
301. Flanagan K, Moroziewicz D, Kwak H, Hörig H, Kaufman HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 2004;231(1–2):75–84.
302. Xu W, Weng J, Xu M, Zhou Q, Liu S, Hu Z, et al. Chemokine CCL21 determines immunotherapy response in hepatocellular carcinoma by affecting neutrophil polarization. *Cancer Immunol Immunother.* 2024 Feb 17;73(3):56.
303. Salem A, Alotaibi M, Mroueh R, Basheer HA, Afarinkia K. CCR7 as a therapeutic target in Cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2021 Jan 1;1875(1):188499.
304. Lee JM, Lee MH, Garon EB, Goldman JW, Salehi-Rad R, Baratelli FE, et al. Phase I trial of intratumoral injection of CCL21 gene modified dendritic cells in lung cancer elicits tumor-specific immune responses and CD8+ T cell infiltration. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Aug 15;23(16):4556–68.
305. Lisberg AE, Liu B, Salehi-Rad R, Lee JM, Tran L, Krysan K, et al. Phase I trial of in situ vaccination with autologous CCL21-modified dendritic cells (CCL21-DC) combined with pembrolizumab for advanced NSCLC. *J Clin Oncol.* 2021 May 20;39(15_suppl):TPS9135–TPS9135.
306. Moeini S, Saeidi M, Fotouhi F, Mondanizadeh M, Shirian S, Mohebi A, et al. Synergistic effect of programmed cell death protein 1 blockade and secondary lymphoid tissue chemokine in the induction of anti-tumor immunity by a therapeutic cancer vaccine. *Arch Virol.* 2017 Feb 1;162(2):333–46.
307. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Arima H, Hirata M, et al. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2009 Jul;35(1):19–24.
308. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5686–93.
309. Ding Y, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi J, Komoto I, et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous

- cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3406–12.
310. Sancho M, Vieira JM, Casalou C, Mesquita M, Pereira T, Cavaco BM, et al. Expression and function of the chemokine receptor CCR7 in thyroid carcinomas. *J Endocrinol*. 2006 Oct;191(1):229–38.
311. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer*. 2003 Jun 10;105(2):186–9.
312. Liu Y, Ji R, Li J, Gu Q, Zhao X, Sun T, et al. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2010 Feb 24;29(1):16.
313. Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*. 2010 May 7;328(5979):749–52.
314. Lin Y, Sharma S, John MS. CCL21 Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2014 May 7;6(2):1098–110.
315. Basu R, Wu S, Kopchick JJ. Targeting growth hormone receptor in human melanoma cells attenuates tumor progression and epithelial mesenchymal transition via suppression of multiple oncogenic pathways. *Oncotarget*. 2017 Feb 16;8(13):21579–98.
316. Basu R, Kopchick JJ. The effects of growth hormone on therapy resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*. 2019 Sep 19;2(3):827–46.
317. Han ZJ, Li YB, Yang LX, Cheng HJ, Liu X, Chen H. Roles of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in the Tumor Microenvironment and Immunotherapy. *Molecules*. 2022 Jan;27(1):137.
318. Sanmamed MF, Carranza-Rua O, Alfaro C, Oñate C, Martín-Algarra S, Perez G, et al. Serum Interleukin-8 Reflects Tumor Burden and Treatment Response across Malignancies of Multiple Tissue Origins. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 13;20(22):5697–707.
319. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2017 Aug 1;28(8):1988–95.
320. Schalper KA, Carleton M, Zhou M, Chen T, Feng Y, Huang SP, et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Med*. 2020 May;26(5):688–92.
321. Yuen KC, Liu LF, Gupta V, Madireddi S, Keerthivasan S, Li C, et al. High systemic and tumor-associated IL-8 correlates with reduced clinical benefit of PD-L1 blockade. *Nat Med*. 2020 May;26(5):693–8.
322. Ruiz EM, Alhassan SA, Errami Y, Abd Elmageed ZY, Fang JS, Wang G, et al. A Predictive Model of Adaptive Resistance to BRAF/MEK Inhibitors in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan;24(9):8407.

323. Goldman A, Majumder B, Dhawan A, Ravi S, Goldman D, Kohandel M, et al. Temporally sequenced anticancer drugs overcome adaptive resistance by targeting a vulnerable chemotherapy-induced phenotypic transition. *Nat Commun.* 2015 Feb 11;6(1):6139.
324. Gunnarsson EB, De S, Leder K, Foo J. Understanding the role of phenotypic switching in cancer drug resistance. *J Theor Biol.* 2020 Apr 7;490:110162.
325. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell.* 2011 Aug 19;146(4):633–44.
326. Knoechel B, Roderick JE, Williamson KE, Zhu J, Lohr JG, Cotton MJ, et al. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2014 Apr;46(4):364–70.
327. Zhou J, Liu C, Tang Y, Li Z, Cao Y. Phenotypic switching as a non-genetic mechanism of resistance predicts antibody therapy regimens. *iScience.* 2024 Apr 19;27(4):109450.
328. Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, et al. A Melanoma Cell State Distinction Influences Sensitivity to MAPK Pathway Inhibitors. *Cancer Discov.* 2014 Jul 6;4(7):816–27.
329. Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun.* 2014 Dec 15;5:5712.
330. Capparelli C, Purwin TJ, Glasheen M, Caksa S, Tiago M, Wilski N, et al. Targeting SOX10-deficient cells to reduce the dormant-invasive phenotype state in melanoma. *Nat Commun.* 2022 Mar 16;13(1):1381.
331. Ballotti R, Cheli Y, Bertolotto C. The complex relationship between MITF and the immune system: a Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Mol Cancer.* 2020 Dec 5;19:170.
332. Chen AF, Liu AJ, Krishnakumar R, Freimer JW, DeVeale B, Belloch R. GRHL2-Dependent Enhancer Switching Maintains a Pluripotent Stem Cell Transcriptional Subnetwork after Exit from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2018 Aug 2;23(2):226-238.e4.
333. Iniguez AB, Alexe G, Wang EJ, Roti G, Patel S, Chen L, et al. Resistance to Epigenetic-Targeted Therapy Engenders Tumor Cell Vulnerabilities Associated with Enhancer Remodeling. *Cancer Cell.* 2018 Dec 10;34(6):922-938.e7.
334. Kieffer-Kwon KR, Tang Z, Mathe E, Qian J, Sung MH, Li G, et al. Interactome maps of mouse gene regulatory domains reveal basic principles of transcriptional regulation. *Cell.* 2013 Dec 19;155(7):1507–20.
335. Liao BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, et al. Adaptive chromatin remodeling drives glioblastoma stem cell plasticity and drug tolerance. *Cell Stem Cell.* 2017 Feb 2;20(2):233-246.e7.
336. Tangella LP, Clark ME, Gray ES. Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2021 Jan 1;1865(1):129736.

337. Manzano JL, Layos L, Bugés C, de Los Llanos Gil M, Vila L, Martínez-Balibrea E, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med.* 2016 Jun;4(12):237.
338. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Mar;44(3):480–8.
339. Zhang J, Zhi X, Shi S, Tao R, Chen P, Sun S, et al. SPOCK1 is up-regulated and promotes tumor growth via the PI3K/AKT signaling pathway in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 22;482(4):870–6.
340. Wang T, Liu X, Tian Q, Liang T, Chang P. Reduced SPOCK1 expression inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and migration through Wnt/ β -catenin signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Feb;22(3):637–44.
341. Yu F, Li G, Gao J, Sun Y, Liu P, Gao H, et al. SPOCK1 is upregulated in recurrent glioblastoma and contributes to metastasis and Temozolomide resistance. *Cell Prolif.* 2016 Apr;49(2):195–206.
342. Zhao P, Guan HT, Dai ZJ, Ma YG, Liu XX, Wang XJ. Knockdown of SPOCK1 Inhibits the Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer Cells by Suppressing the PI3K/Akt Pathway. *Oncol Res.* 2016 Oct 27;24(6):437–45.
343. Yan L, Sun K, Liu Y, Liang J, Cai K, Gui J. MiR-129-5p influences the progression of gastric cancer cells through interacting with SPOCK1. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2017 Jun;39(6):1010428317706916.
344. Yao LY, Ma J, Zeng XM, Ou-yang J. MicroRNA-155-5p inhibits the invasion and migration of prostate cancer cells by targeting SPOCK1. *Oncol Lett.* 2020 Dec 1;20(6):1–1.
345. Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Katada K, Okato A, Arai T, et al. Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell aggressiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2018 Aug;45(4):854–65.
346. Osako Y, Seki N, Koshizuka K, Okato A, Idichi T, Arai T, et al. Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *J Hum Genet.* 2017 Nov;62(11):935–44.

Annex

TAULES SUPLEMENTÀRIES

Taula suplementària 1. Gens amb diferències d'expressió que compleixen la ràtio de $\text{Log}_2(\text{fold change}) > 1.5$ i < -1.5 i p-valor $< 0,05$ entre els pacients amb alt benefici clínic vs els de baix benefici clínic en la cohort de inhibidors de BRAF+MEK, ordenats per p-valor ajustat (test t-student no aparellada).

	$\text{LOG}_2(\text{FOLD CHANGE})$	P-VALOR
ITGB8	-2,74	0,000114
CDH2	-2,57	0,000232
COL11A2	2,72	0,00449
DEFB134	-2,17	0,00511
CCL21	-2,67	0,00574
LIF	-2,03	0,00902
GHR	-1,84	0,00998
COMP	1,82	0,02
IL1B	2,08	0,02
MS4A6A	1,77	0,024
APLNR	1,7	0,0273
ESR1	-2,08	0,0346
CXCL8	1,77	0,0422

Taula suplementària 2. Gens amb diferències d'expressió que compleixen la ràtio de $\text{Log}_2(\text{fold change}) > 1.5$ i < -1.5 i $p\text{-valor} < 0,05$ entre els pacients amb alt benefici clínic vs els de baix benefici clínic en la cohort d'immunoteràpia, ordenats per $p\text{-valor}$ ajustat (test t-student no aparellada).

	LOG ₂ (FOLD CHANGE)	P-VALUE
IFITM1	1,87	0,00166
WNT5B	4,41	0,00183
HERC6	2,05	0,0019
CCNA1	-2,22	0,00217
WNT2	-3,78	0,00306
ANGPT1	-4,08	0,00343
CD8B	4,01	0,00383
CX3CL1	1,77	0,00427
CXCL8	-6,15	0,00461
CD19	3,88	0,00474
LTB	4,75	0,00487
CCR5	1,52	0,00532
TNFRSF10C	-3,58	0,00619
CCL21	4,55	0,00643
VCAM1	1,9	0,00701
CD79A	5,4	0,00709
FAM30A	3,81	0,0073
GZMK	5,5	0,00762
PTGER4	1,92	0,0079
MS4A1	3,81	0,00841
CCL20	-3,52	0,00892
HLA-DQA2	4,77	0,00983
GAS1	1,72	0,00984
CD8A	4,6	0,00993
ITGAL	3,91	0,00997
FOXP3	2,17	0,0101
CD27	4,65	0,0103
CTSW	3,72	0,0107
PPARGC1B	1,93	0,0115
ZAP70	4,1	0,0118
GNLY	4,2	0,0118
HLA-C	2,67	0,0126
HLA-F	3,55	0,0133
SH2D1A	4,54	0,0134
PSMB9	2,88	0,0138
CD6	2,92	0,0141
LAG3	4,27	0,0147
TREM1	-3,3	0,0149
CD96	3,25	0,0156
VEGFA	-3,18	0,0158
HIF1A	-1,65	0,016
STAT1	2,1	0,0161
UBA7	2,86	0,0167
XCL1/2	1,73	0,0168

CXCL3	-2,98	0,0169
NKG7	4,11	0,0173
CD3E	3,87	0,0182
IRF1	2,74	0,0183
JAK2	2,1	0,0184
STC1	-3,22	0,0192
NLRC5	2,11	0,0194
IL2RG	2,62	0,0198
PTGS2	-3,01	0,02
TAPBP	1,52	0,0201
CD3G	4,22	0,0202
SLC11A1	-3,06	0,0204
CCL5	3,46	0,0206
PPARG	-1,99	0,022
TAPBPL	1,84	0,0227
CXCL1	-3,53	0,0233
TAP1	1,82	0,0234
IL6	-2,56	0,0235
IL2RB	2,64	0,0238
CD45RO	2,41	0,0247
TIGIT	3,66	0,0254
CXCL9	3,04	0,0264
CD74	2,1	0,0265
CD244	2,42	0,0266
PSMB10	2,12	0,027
SOX11	-3,89	0,0271
BCL2	2,34	0,0274
CLECL1	3,42	0,0275
CD3D	4,03	0,028
SELL	1,78	0,0288
OAS2	1,77	0,0289
HLA-DRB1	2,56	0,0298
HRAS	1,64	0,03
CCL4	2,7	0,0308
IL1B	-3,78	0,0317
CXCR3	2,75	0,0327
KLRD1	3,42	0,0333
FCAR	-2,36	0,0337
TNFRSF18	2,8	0,0342
FCRL2	3,11	0,0348
IDO1	2,86	0,0348
ICAM3	1,55	0,0352
SOX2	-5,22	0,0355
CD45RA	2,94	0,0368
TAP2	2	0,0371
TNFSF13	2,16	0,0374
DUSP2	2,66	0,0382
NFKB2	1,84	0,0384

CSF2RB	1,81	0,0394
CXCL5	-3,79	0,0404
LILRB4	2,26	0,0414
MAGEB2	2,52	0,0419
TNFSF8	1,75	0,0423
GBP4	1,71	0,0437
NCR1	2,52	0,0446
PALMD	1,79	0,0447
APOL6	1,54	0,0447
C7	2,62	0,0463
THBS1	-1,66	0,0485
BIRC3	2,06	0,0485
NGFR	-2,34	0,0499

Taula suplementària 3. Llistat dels 88 gens sobreexpressats en la línia resistent, seleccionats com a biomarcadors de resistència segons els resultats de l'anàlisi d'expressió diferencial entre les cèl·lules resistents i les sensibles (Wilcoxon Rank Sum test). Abreviacions: AVG_LOG2FC = Ràtio de la mitja del valor d'expressió del gen en el grup resistent vs el sensible en escala Log₂; %PCT = percentatge de clons cel·lulars sensibles (%PCT.S) i resistents (%PCT.R) que expressen el gen; P_VAL_ADJ: p-valor ajustat per la correcció de Bonferroni per a comparacions múltiples; PCT.R/PCT.S = Ràtio que indica la diferència entre els percentatges de clons cel·lulars que expressen el gen entre ambdues línies.

GEN	AVG_LOG ₂ FC	%PCT.S	%PCT.R	P_VAL_ADJ	PCT.R/PCT.S
COL5A1	3,10	0,1	98,8	0	988
CD24	2,53	0,1	95,0	0	950
FSCN1	1,99	0,1	89,7	0	897
IL6	2,08	0,1	76,5	0	765
CCL5	3,23	0,1	65,1	0	651
EHD2	2,23	0,2	93,0	0	465
MEG3	2,11	0,2	84,9	0	425
COL3A1	3,61	0,3	99,1	0	330
FBLIM1	1,68	0,4	83,5	0	209
PCSK2	1,95	0,5	86,8	0	174
F3	2,17	0,7	88,1	0	126
SAA1	2,11	0,6	67,0	0	112
COL1A2	3,87	0,9	99,5	0	111
SLC16A3	1,78	0,8	86,3	0	108
IFITM2	1,51	0,8	78,9	0	99
MT1E	3,53	1,1	98,2	0	89
DIO2	1,91	1,0	80,2	0	80
SCG5	1,63	1,4	70,8	0	51
IFI27	3,93	2,1	91,0	0	43
S1PR3	1,57	1,9	80,1	0	42
ADM	1,66	1,9	79,0	0	42
IGFBP3	3,36	2,6	98,0	0	38
LOXL2	2,26	2,5	93,8	0	38
SPOCD1	1,54	2,1	77,8	0	37
MICAL2	1,67	2,5	82,8	0	33
CRIM1	1,93	3,1	88,9	0	29
MYOF	2,06	3,4	91,6	0	27
BST2	3,11	3,7	99,4	0	27
KRT18	3,48	3,9	98,2	0	25
ITGA1	1,58	3,2	78,0	0	24
DKK1	1,78	3,1	73,2	0	24
SDC4	1,56	3,9	78,8	0	20
SPOCK1	1,78	4,6	85,3	0	19
TAGLN	4,49	5,5	99,3	0	18
IFI44L	1,64	4,5	80,4	0	18
ITGA3	1,79	5,1	87,0	0	17
COL12A1	1,65	5,0	81,7	0	16
IL7R	2,10	5,4	86,8	0	16
IGFBP5	3,69	5,6	86,0	0	15
COL1A1	4,84	7,1	99,9	0	14

IFIT3	2,45	6,4	85,4	0	13
ITGA5	1,54	6,2	76,6	0	12
XAF1	1,96	8,0	90,0	0	11
MAP1B	3,03	10,6	99,0	0	9
KRT81	5,40	11,0	99,9	0	9
COL18A1	1,78	10,1	86,4	0	9
SERPINH1	2,56	11,4	97,5	0	9
MYADM	1,78	10,8	89,4	0	8
C12ORF75	1,98	11,1	90,5	0	8
TNNT1	1,73	11,4	89,4	0	8
GBP1	1,79	11,1	85,9	0	8
MME	1,98	11,8	90,8	0	8
CCN1	3,33	13,1	99,1	0	8
CCDC80	2,51	13,2	95,3	0	7
CDC42EP3	1,65	12,4	85,3	0	7
MX1	1,78	12,9	87,1	0	7
TP53I11	1,58	12,8	85,1	0	7
PDLIM1	1,73	13,6	89,4	0	7
CAV2	1,77	14,3	89,5	0	6
COL4A1	2,15	15,4	91,3	0	6
TPD52L1	1,53	14,4	82,3	0	6
CNN2	1,54	17,7	86,7	0	5
RND3	2,56	21,7	97,7	0	5
RHOBTB3	2,93	22,0	98,5	0	4
TNC	1,60	18,4	82,0	0	4
FLNB	1,77	20,9	91,3	0	4
SRGN	1,58	20,9	85,8	0	4
ZNFX1	1,51	21,5	86,4	0	4
MYLK	1,51	20,9	82,4	0	4
ZFP36L1	2,18	26,2	96,1	0	4
SNAPC1	1,80	24,2	85,7	0	4
IGFBP4	1,73	25,6	89,5	0	3
CAV1	4,32	31,0	100,0	0	3
PRSS23	2,10	30,0	95,3	0	3
IL6ST	1,54	27,8	88,3	0	3
CAVIN1	3,32	31,8	100,0	0	3
CKAP4	1,83	30,1	94,6	0	3
FSTL1	2,26	31,3	97,9	0	3
ISG15	3,57	33,2	99,8	0	3
SELENOM	2,16	34,3	96,8	0	3
ZYX	1,62	33,9	92,7	0	3
PLK2	1,57	34,8	89,9	0	3
VCL	2,31	40,0	98,9	0	2
ANXA1	1,80	39,2	96,0	0	2
SOD2	1,56	34,3	84,0	0	2
IFI6	1,57	41,5	94,7	0	2
TPM1	5,51	47,2	100,0	0	2
CDC25B	1,50	44,4	92,3	0	2

Taula suplementària 4. Llistat dels 23 marcadors de sensibilitat, amb decrement d'expressió en la línia resistent vs la sensible (Wilcoxon Rank Sum test). Abreviacions: AVG_LOG2FC = Ràtio de la mitja del valor d'expressió del gen en el grup sensible vs el resistent en escala Log₂; PCT = percentatge de clons cel·lulars sensibles (PCT.S) i resistents (PCT.R) que expressen el gen; P_VAL_ADJ: p-valor ajustat per la correcció de Bonferroni per a comparacions múltiples; PCT.R/PCT.S = Ràtio que indica la diferència entre els percentatges de clons cel·lulars que expressen el gen en ambdues línies.

GEN	AVG_LOG ₂ FC	%PCT.S	%PCT.R	P_VAL_ADJ	PCT.S/PCT. R
TYR	1,63	83,1	0	0	-
SOX10	1,5	80,8	0	0	-
APOD	2,11	79,4	0	0	-
PLP1	1,5	79,4	0	0	-
RAB38	1,72	83,3	0,3	0	277,7
CAPN3	2,18	91,7	2	0	45,9
LHFPL3 AS1	2,28	93,2	2,6	0	35,8
MIA	2,58	96,9	4,1	0	23,6
S100A1	2,77	98,3	5,4	0	18,2
TYRP1	2,40	85,4	8	0	10,7
MLANA	3,50	98,2	10,2	0	9,6
BCAS3	2,10	93,7	10,2	0	9,2
PMEL	3,78	99,7	12,5	0	8,0
QPCT	1,67	84,6	15	0	5,6
DCT	4,17	99,6	16,1	0	6,2
S100B	4,22	99,9	16,9	0	5,9
FABP5	2,34	96,6	18,5	0	5,2
PIR	1,61	90,2	25,1	0	3,6
MITF	1,52	88,9	27,4	0	3,2
MFSD12	2,12	0,972	0,408	0	2,4
MT-ND4L	1,55	0,953	0,435	0	2,2
MTRNR2L8	1,77	0,972	0,443	0	2,2
ASAH1	1,5	0,932	0,485	0	1,9

Taula suplementària 5. Taula de pacients de la cohort GSE61992 inclosos en la validació *in silico* del gen *SPOCK1* com a biomarcador de resistència, extreta de (277).

Table 1 Patient, treatment outcome and resistance characteristics.													
Patient	Age/ sex	BRAF geno type	Prior MAPKi	Daily dose (dab/ tram)	RECIST response category	RECIST % response	PFS (months)	OS (months)	Prog no.	Time to Prog biopsy (months)	Site	Resistance mechanism	MAPK activity*
C1	41/M	V600E	x	300/1.5	SD	11	2.6	3.1	1	2.8	SQ	MEK1 ^{G128D} , MEK2 ^{C125S}	+
C2	27/M	V600K	x	300/2	SD	-14	3.1	6.8	1	3.2	SQ	NRAS ^{Q61K}	+
C3	44/M	V600E	Tram- PD [†]	300/2	SD	-2	3.5	6.5	1	4.4	Bowel	BRAF amp MEK2 ^{C125S}	+
C4	50/M	V600E	x	150 [‡] /2	PR	-63	3.6	12.9	1	4.8	Bowel	Unknown	+
C5	46/F	V600K	x	300/2	PR	-53	3.6	10.7	1	4.1	SQ	MEK2 ^{E207K} , NRAS ^{G12D} , NRAS ^{Q61K}	-
C6	76/F	V600K	x	300/2	SD	-4	4.2	5.2	1	4.0	SQ	NRAS ^{Q61K}	+
C7	43/M	V600E	x	150 [‡] /2 [§]	PR	-52	5.3	13.5	1	6.4	Peritoneum	BRAF amp	+
C8	67/F	V600K	x	300/2	PR	-73	8.9	>33.5	1	10.3	SQ	Unknown	NA
C9	66/M	V600E	x	300/2	PR	-96	9.1	>15.7	1	9.5	SQ	BRAF amp	+
C10	55/F	V600K	Dab- PR [¶]	300/2	SD	-17	9.2	>40.0	1	10.2	Omentum	BRAF amp	+

dab, dabrafenib; F, female; M, male; MAPKi, MAPK inhibitor; NA, data not available; OS, overall survival; PD, progressive disease; PFS, progression-free survival; PR, partial response; SD, stable disease; SQ, subcutaneous; tram, trametinib.
*MAPK activity was determined using gene set enrichment analysis of whole transcriptome data comparing matched pre-treatment (n=9) and Prog (n=10) biopsies. + indicates reactivated and - indicates inhibited.
[†]Trametinib 2 mg per day for weeks 1-8 with PD at week 8. CombiDT commenced at week 10.
[‡]Hydroxypropyl methylcellulose preparation.
[§]150[‡]/0 for 4 weeks, then 150[‡]/2 thereafter.
[¶]Dab 300 mg per day for 31 weeks, with PR at week 6 and PD at week 31. CombiDT commenced 2 weeks later.

FIGURES SUPLEMENTÀRIES

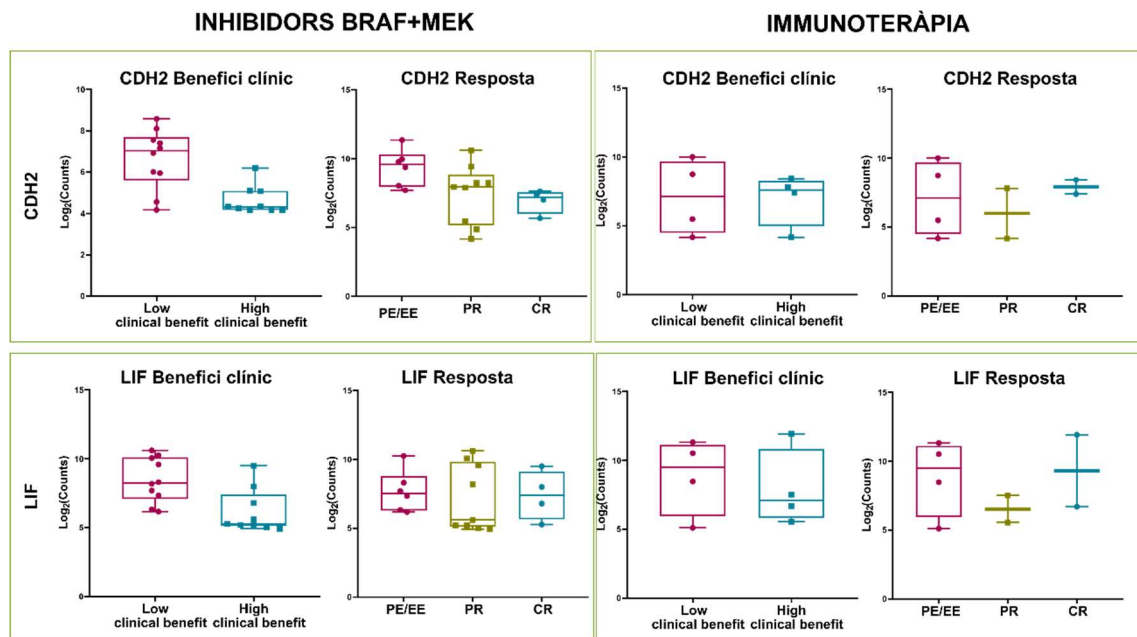


Figura suplementària 1. Candidats descartats com a marcadors pronòstic negatiu. Representació en *box plot* dels nivells d'expressió dels gens *CDH2* i *LIF* segons el benefici clínic i la resposta dels pacients en cada cohort de tractament. Abreviacions: PE/EE = progressió/estabilització (no resposta); PR = resposta parcial; CR = resposta completa.

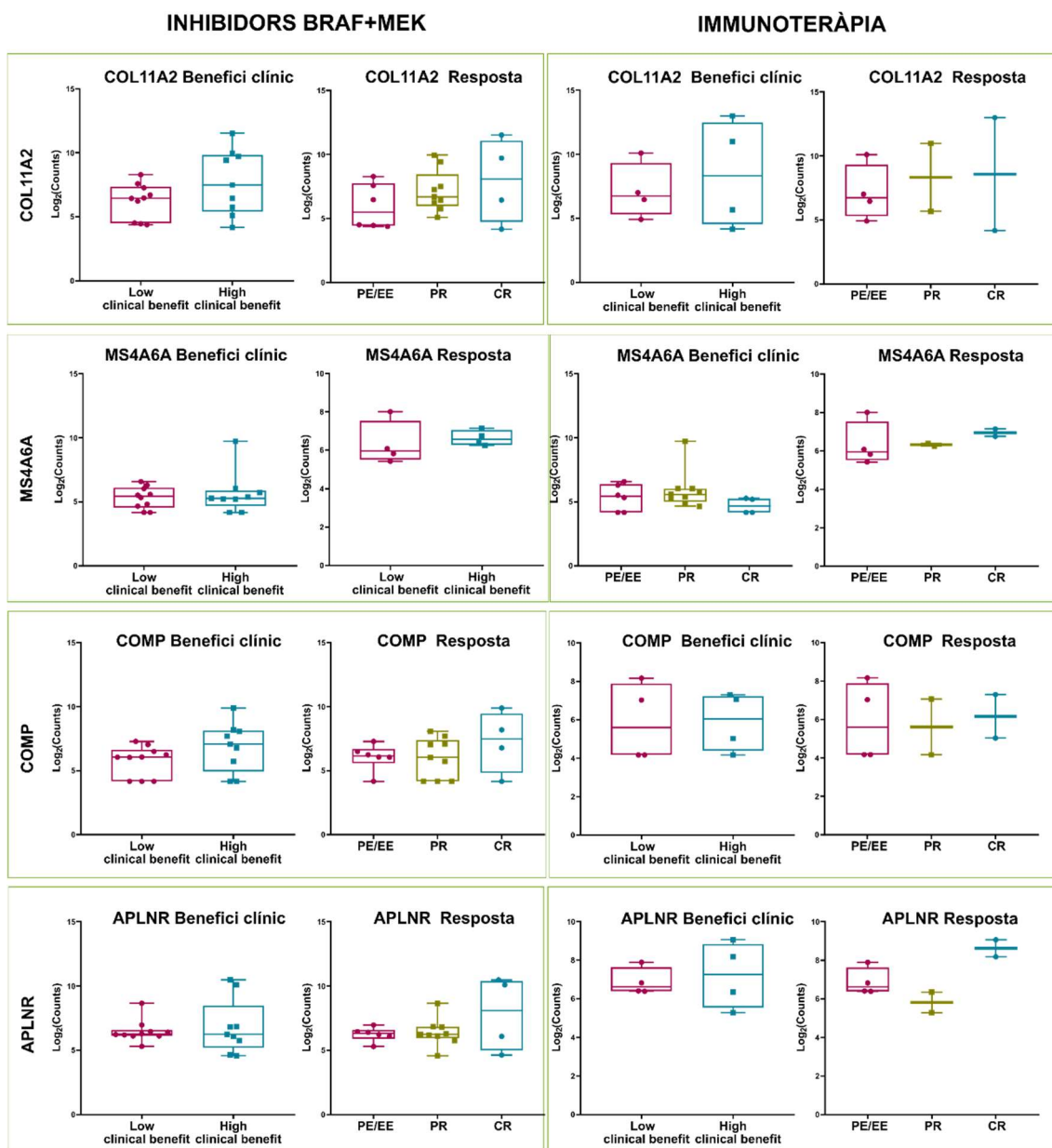


Figura suplementària 2. Candidats descartats com a marcadors pronòstic positius. Representació en *box plot* dels nivells d'expressió dels gens *COL11A2*, *MS4A6A*, *COMP* i *APLNR* segons el benefici clínic i la resposta dels pacients en cada cohort de tractament. Abreviacions: PE/EE = progressió/estabilització (no resposta); PR = resposta parcial; CR = resposta completa.

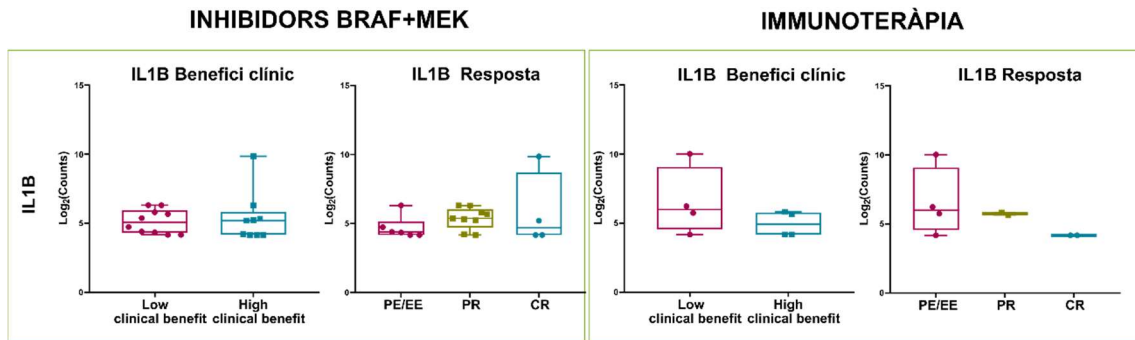


Figura suplementària 3. Candidat descartat com a marcador de selecció terapèutica. Representació en *box plot* dels nivells d'expressió del gen *IL1B* segons el benefici clínic i la resposta dels pacients en cada cohort de tractament. Abreviacions: PE/EE = progressió/estabilització (no resposta); PR = resposta parcial; CR = resposta completa.

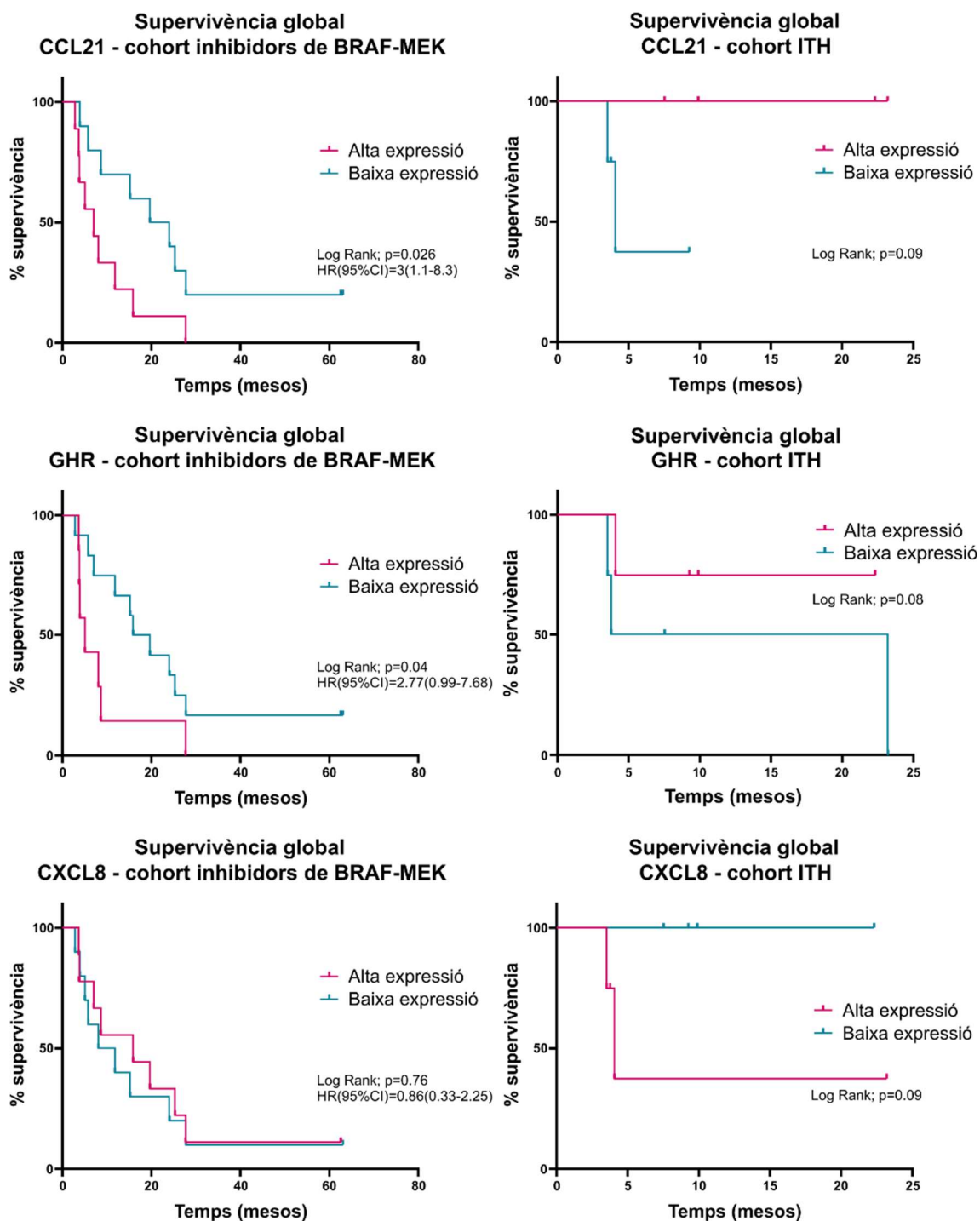


Figura suplementària 4. Corbes Kaplan-Meier de la SG en la cohort de pacients tractats amb inhibidors de BRAF+MEK (esquerra) i la cohort de pacients tractats amb immunoteràpia (dreta) estratificant per alta o baixa expressió de *CCL21*, *GHR* i *CXCL8*. ITH = Immunoteràpia. Es considera estadísticament significatiu un p-valor (Log Rank) < 0,05. Anàlisi univariada de Cox: HR(95%CI) = hazard ratio (95% interval de confiança).

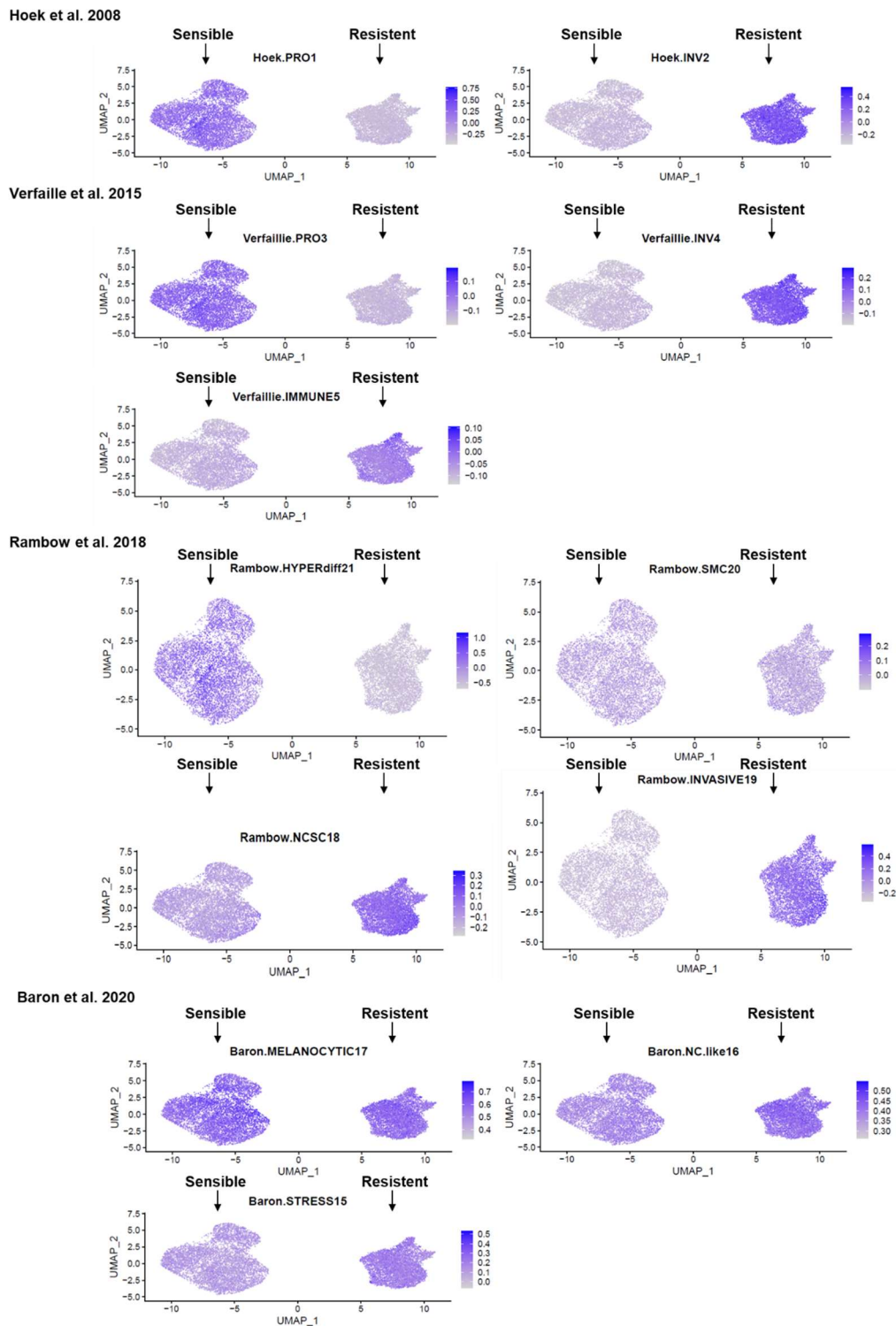


Figura suplementària 5. Projeccions UMAP per representar per *scoring* l'enriquiment de l'expressió de les signatures més significatives, descrites a la bibliografia (232,234,239,240), en els clons cel·lulars de la línia sensible i resistent. El *scoring* es va realitzar utilitzant la funció *AddModuleScore()* de l'entorn Seurat en R. La barra lateral representa el nivell de correlació per una gradació de lila, essent el més intens el valor major. Les cèl·lules sensibles expressaven signatures de fenotip proliferatiu (Hoek.PRO1; Verfaillie.PRO3) i diferenciat (Rambow.HYPERdiff21); les cèl·lules resistents expressaven signatures de fenotip de tipus invasiu (Hoek.INV2; Verfaillie.INV4; Rambow.INVASIVE19), i un lleu enriquiment de signatures de fases intermèdies (Rambow.NCSC18; Baron.NC.like).

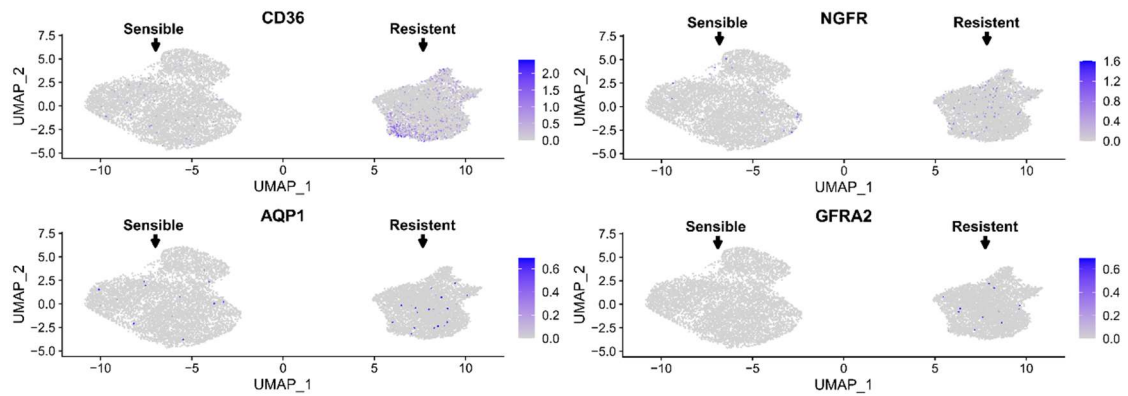


Figura suplementària 6. Projeccions UMAP per representar per *scoring* l'enriquiment de l'expressió dels principals gens implicats en el fenotip intermedi, descrits a la bibliografia, en els clons cel·lulars de la línia sensible i resistent. El *scoring* es va realitzar utilitzant la funció *AddModuleScore()* de l'entorn Seurat en R. La barra lateral representa el nivell de correlació per una gradació de lila, essent el més intens el valor major.

Pathway	Gene ranks	SPOCK1 ⁻	SPOCK1 ⁺	NES	pval	padj
Hoek.PRO				-1.24	1.4·10 ⁻¹	2.7·10 ⁻¹
Hoek.INV				-1.36	5.4·10 ⁻²	2.1·10 ⁻¹
Verfaillie.PRO				-1.14	1.1·10 ⁻¹	2.7·10 ⁻¹
Verfaillie.INV				-1.21	2.9·10 ⁻²	2.0·10 ⁻¹
Verfaillie.IMMUNE				-0.62	1.0·10 ⁰	1.0·10 ⁰
Tirosh.MITF				-1.05	3.8·10 ⁻¹	5.5·10 ⁻¹
Tirosh.AXL				-1.65	8.3·10 ⁻⁴	8.7·10 ⁻³
Tsoi.UNDIFF				-0.73	9.5·10 ⁻¹	10.0·10 ⁻¹
Tsoi.NEURAL.CREST.like				-1.29	8.4·10 ⁻²	2.2·10 ⁻¹
Tsoi.TRANSITORY				1.41	5.8·10 ⁻²	2.1·10 ⁻¹
Tsoi.MELANOCYTIC				-1.32	6.4·10 ⁻²	2.1·10 ⁻¹
Wouters.INTERMEDIATE				0.92	9.0·10 ⁻¹	10.0·10 ⁻¹
Wouters.MES-like				-1.22	5.0·10 ⁻⁵	1.0·10 ⁻³
Wouters.MELANOCYTIC				-1.04	2.6·10 ⁻¹	4.2·10 ⁻¹
Baron.STRESS				-1.31	7.0·10 ⁻²	2.1·10 ⁻¹
Baron.NC-like				-1.11	2.2·10 ⁻¹	3.9·10 ⁻¹
Baron.MELANOCYTIC				-1.02	4.5·10 ⁻¹	5.6·10 ⁻¹
Rambow.NCSC				-1.01	4.6·10 ⁻¹	5.6·10 ⁻¹
Rambow.INVASIVE				-1.24	1.4·10 ⁻¹	2.7·10 ⁻¹
Rambow.SMC				0.69	9.0·10 ⁻¹	10.0·10 ⁻¹
Rambow.HYPERdiff				-1.07	4.0·10 ⁻¹	5.5·10 ⁻¹

Figura suplementària 7. Taula amb els resultats de l'anàlisi per GSEA, per determinar l'enriquiment de les signatures descrites a la bibliografia en els clons cel·lulars en la línia sensible, segons l'expressió de SPOCK1 (SPOCK1⁻ vs SPOCK1⁺), observant en els clons SPOCK1⁺ un enriquiment de signatures "mesenquimals" i "invasives". A la figura: "pathway" és el nom de la signatura, "padj" és el p-valor ajustat pel mètode de Benjamini-Hochberg per a comparacions múltiples i "NES" o *normalized enrichment score*.

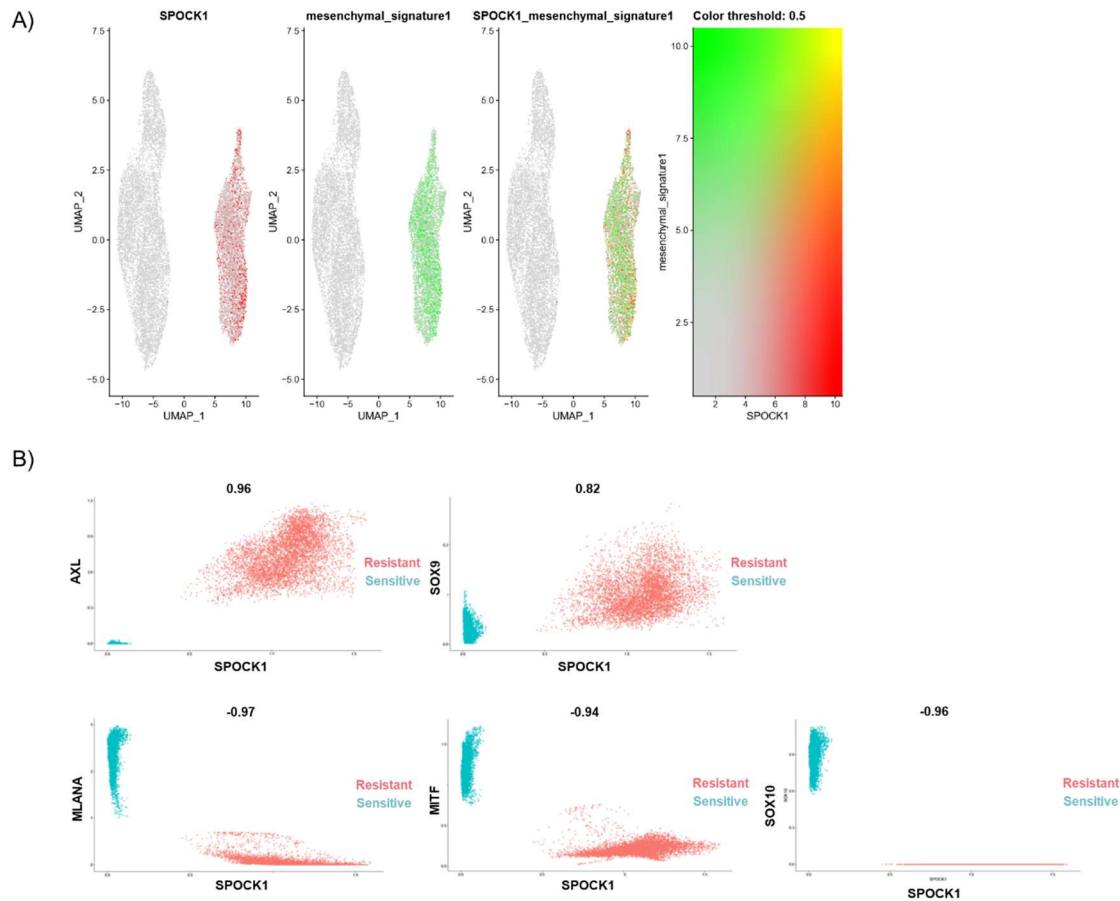


Figura suplementària 8. Representació gràfica de l'anàlisi de la correlació per clon cel·lular de l'expressió del gen *SPOCK1* signatures mesenquimals i gens d'interès implicats en els fenotips invasiu i proliferatiu en la línia sensible i resistent. **A)** Projeccions UMAP de l'expressió per clon cel·lular del gen *SPOCK1* (esquerre; vermell), les signatures mesenquimals (mig; verd), i la coexpressió d'ambdós (dreta). S'observa una coexpressió de *SPOCK1* amb fenotips mesenquimals en la condició resistent. **B)** Representació gràfica de la correlació per clons cel·lulars entre l'expressió del gen *SPOCK1* (eix ordenades) i els gens *AXL*, *SOX9*, *MLANA*, *MITF* i *SOX10* (eix coordenades) utilitzant l'eina de R *magic*. S'observa una coexpressió de *SPOCK1* amb *AXL* i *SOX9*, i una correlació negativa entre *SPOCK1* i *MLANA*, *MITF* i *SOX10*.

ACTIVITATS I PUBLICACIONS

Presentacions en congressos:

- **Solé-Blanch C**, et al. Gene expression signature as a predictive tool to select between target therapy or immunotherapy in BRAF-mutated cutaneous melanoma patients. EACR congress 2023. June 2023, Turin (Italy). Abst. EACR23-1120. Poster.
- **Solé-Blanch C**, et al. Cytokine and chemokine gene expression signature as a predictive tool to select between target therapy or immunotherapy in BRAF-mutated cutaneous melanoma patients. EACR "Defense is the Best Attack". May 2023, Barcelona (Spain). Poster n.75
- **Carme Solé-Blanch**; Adrià Bernat-Peguera; Hedia Tnani; Sofia España; Aram Boada; Ariadna Quer; Anna Esteve-Codina; José Luis Manzano; Anna Martínez-Cardús. Deciphering resistance acquisition to BRAF and MEK inhibitors in BRAF-mutated cutaneous melanoma using an in vitro model at single-cell level. The 19th International Congress of the Society for Melanoma Research. Society for Melanoma Research. 2022. Reino Unido. Poster n. P-162
- **Carme Solé-Blanch**; Sofia España; Adrià Bernat-Peguera; Aram Boada; Laia Perez-Roca; Ariadna Quer; Jose Luis Manzano; Anna Martínez-Cardús. Gene expression signature as a predictive tool to select the best therapeutic choice in BRAF-mutated cutaneous melanoma patients' candidate to receive either target therapy or immunotherapy. EACR Congress. 2022. España. Poster.
- **Carme Solé-Blanch**; Adrià Bernat Peguera; Sebastián Moran; Aram Boada; Ariadna Quer; Sofia España; Laia Perez Roca; José Luis Manzano; Anna Martínez Cardús. Epigenetic profiling as predictive tool of target therapy efficacy in BRAF-mutated cutaneous melanoma that received BRAF inhibitors based therapy. EACR congress. 2020. Italia (online). Poster.

Publicacions en revistes indexades:

- Ruiz de Porras V, Bernat-Peguera A, Alcon C, Lagua F, Fernández-Saorin M, Jiménez N, Senan-Salinas A, **Solé-Blanch C**, Feu A, Marín-Aguilera M, Pardo JC, Ochoa-de-Olza M, Montero J, Mellado B, Font A. Dual inhibition of MEK and PI3K β / δ -a potential therapeutic strategy in PTEN-wild-type docetaxel-resistant metastatic prostate cancer. *Front Pharmacol.* 2024 Jan 22;15:1331648. doi: 10.3389/fphar.2024.1331648. PMID: 38318136; PMCID: PMC10838968.
- Sun C, España S, Richarz N, **Solé-Blanch C**, Boada A, Martínez-Cardús A, Chu A, Liu Z, Manzano JL. Targeted therapy or immunotherapy in BRAF-mutated metastatic melanoma: a Spanish center's decade of experience. *Front Oncol.* 2024 Feb 21;14:1322116. doi: 10.3389/fonc.2024.1322116. PMID: 38450188; PMCID: PMC10915752.
- Ruiz de Porras V, Wang XC, Palomero L, Marín-Aguilera M, **Solé-Blanch C**, Indacochea A, Jimenez N, Bystrup S, Bakht M, Conteduca V, Piulats JM, Buisan O, Suarez JF, Pardo JC, Castro E, Olmos D, Beltran H, Mellado B, Martínez-Balibrea E, Font A, Aytes A. Taxane-induced Attenuation of the CXCR2/BCL-2 Axis Sensitizes Prostate Cancer to Platinum-based Treatment. *Eur Urol.* 2021 Jun;79(6):722-733. doi: 10.1016/j.eururo.2020.10.001. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33153817; PMCID: PMC8088452.
- España Fernandez S, Sun C, **Solé-Blanch C**, Boada A, Martínez-Cardús A, Manzano JL. Immunotherapy Resumption/Rechallenge in Melanoma Patients after Toxicity: Do We Have Another Chance? *Pharmaceutics.* 2023 Mar 2;15(3):823. doi: 10.3390/pharmaceutics15030823. PMID: 36986683; PMCID: PMC10052939.

Assistència a congressos:

- EACR congress 2023. Juny 2023, Turin, Italia
- EACR “Defense is the Best Attack”. Maig 2023, Barcelona, Espanya.
- The 19th International Congress of the Society for Melanoma Research. Society for Melanoma Research. 2022. Edinburgh, Regne Unit.
- EACR Congress. 2022. Sevilla, España.
- EACR congress. 2020. Italia (online).

Activitats formatives (cursos, seminaris, conferències), realitzades durant el doctorat

- **Sessions CARE:** Aquests seminaris estan organitzats pel programa CARE a l'IGTP. Se celebren quinzenalment, els dimecres a les 16:00 amb la participació de ponents locals i externs que cobreixen aspectes de recerca bàsica, clínica i translacional del càncer.
- **Lab meetings RCPB-B-ARGO:** Aquestes sessions estan organitzades pels líders dels grups RCPB i B-ARGO i són participades només pels membres del grup, que presenten el seu treball actual amb l'objectiu de discutir-lo amb els seus companys de laboratori. Se celebren quinzenalment els dimecres a les 15:00.
- **Coffee talks:** Aquestes sessions estan organitzades per l'IGTP i estan dirigides principalment a estudiants de doctorat i postdocs del campus de l'IGTP. Aquí presenten el seu treball actual.

Seminaris:3Rs seminars (CMCiB):

- Com escollir el millor analgèsic per al teu animal, 11 abril 2024
- The importance of selecting the proper mouse strain for your research, 4 Juliol 2023
- Preparació de la documentació necessària per a un estudi amb models animals: els formularis del CEEA
- Göttingen Minipigs and it's use as large animal model in Europe, 9 gener 2020
- How can computational models benefit biomedical research?, 5 desembre 2019
- Modelos murinos inmunodeficientes para estudios de hematopoesis sana, leucemia aguda e inmunoterapia, 7 novembre 2019

Cursos:

- VIII Curso de Manejo Multidisciplinar del Melanoma, 9 de maig 2024
- VII curs B-ARGO d'immunoteràpia: camí de la immunoteràpia personalitzada, 4 d'octubre 2023
- VII Curso de Manejo Multidisciplinar sobre el Diagnóstico y Tratamiento del Melanoma, 5 de maig 2022

- VI CURS B-ARGO D'IMMUNOTERÀPIA: Avançant en el tractament dels pacients amb càncer, 2 i 3 de novembre 2022
- VI SYMPOSIUM LIQUID BIOPSY, gener 2021 • 3rd ASEICA EDUCATIONAL SYMPOSIUM, 23-25 novembre 2021
- III Jornadas de Investigación Traslacional en Tumores Urológicos, 30 i 31 de gener 2020
- Emerging immunotherapies in Cancer, 17 de setembre 2020
- VI Curso de Manejo Multidisciplinar sobre el diagnóstico y Tratamiento del melanoma, 3 de desembre 2020

Altres mèrits:

- Capacitació del personal que manipuli els animals utilitzats, criats o subministrats amb finalitats d'experimentació i altres fins científics, incloent-hi la docència