

Quimiorresistencia del melanoma

Chemoresistance to melanoma

► María Marcela Barrio*

* Dra. en Biología. Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA. Instituto Alexander Fleming

Resumen

Varias estrategias terapéuticas como la cirugía, radioterapia y quimioterapia están siendo utilizadas para tratar el cáncer. Sin embargo, en el caso del melanoma solamente la cirugía en las etapas tempranas de la enfermedad (estadios I-II) puede ser curativa en una alta proporción de pacientes. El tratamiento quimioterápico con dacarbacina (DTIC) así como combinaciones con cisplatino, vinblastina y carmustina resulta ineficaz para eliminar las células de melanoma, ya que sólo se alcanza una respuesta en alrededor del 10% de los pacientes sin prolongar la supervivencia. La quimiorresistencia puede deberse tanto a una falta de respuesta primaria del melanoma como al desarrollo de mecanismos de resistencia adquiridos por el tumor, comúnmente definidos como multi-resistencia a drogas (MDR). En este artículo se analizan los principales mecanismos responsables de dicha resistencia y cómo el conocimiento de los mismos es aplicado al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Por último, se discuten las recientes estrategias que combinan la quimioterapia con la inmunoterapia (Bioquimioterapia) para optimizar el tratamiento del melanoma metastásico.

Palabras clave: melanoma * quimiorresistencia * quimioterapia * inmunoterapia

Summary

Several therapeutic strategies such as surgery, radiotherapy and chemotherapy are being used to treat cancer. However, in the case of melanomas, only surgery during the early stages (stages I-II) of the disease can be curative in a high proportion of patients. Chemotherapy treatment with dacarbazine (DTIC) as well as combinations with cisplatin, vinblastine and carmustine proves to be ineffective to eliminate melanoma cells, since only 10% of patients responded positively without prolonging survival. Chemoresistance can be caused by both a lack of primary response of the melanoma and the development of resistance mechanisms acquired by the tumor usually defined as multi-drug resistance (MDR). The most important mechanisms responsible for such resistance and how the knowledge of those mechanisms is applied to the development of new therapeutic agents are analyzed in this article. Finally, the latest strategies that combine chemotherapy and immunotherapy (Biochemotherapy) to optimize the treatment of metastatic melanoma will be further discussed.

Keywords: melanoma * chemoresistance * chemotherapy * immunotherapy

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resistencia a la quimioterapia en melanoma

El tratamiento del cáncer en la actualidad incluye varias estrategias terapéuticas como la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, en el caso del melanoma la cirugía puede ser curativa en un alto porcentaje de pacientes sólo cuando éstos se hallan en las etapas tempranas de la enfermedad (estadios I-II).

Una vez que el melanoma ha invadido la dermis profunda, si se presentan lesiones ulceradas o si aparecen metástasis en los ganglios linfáticos el pronóstico empeora. La sobrevida a 5 años para pacientes con metástasis distantes es menos de 15% (1).

En general los agentes quimioterapéuticos como la Dacarbacina (DTIC) no logran eliminar a las células de melanoma eficientemente y sólo se obtienen respuestas clínicas en el 7,5-12,1% de los casos, reportándose una sobrevida de 6,4-7,8 meses (2). Esto puede deberse a una falta de respuesta primaria a la droga o al desarrollo de resistencia adquirida por el tumor para la droga, llamada comúnmente multi-resistencia a drogas (MDR, *multi-drug resistance*). La identificación de genes específicos involucrados en el proceso indica que existen tres mecanismos principales de resistencia a las drogas: a) disminución en la captación de las drogas tales como el cisplatino, análogos de nucleósidos y antagonistas del metabolismo del folato, debido a alteraciones en los transportadores; b) alteraciones en las células tumorales resultantes en la incapacidad de una droga de matar a la célula, como ser, defectos de las vías apoptóticas y c) un incremento en el eflujo activo de drogas hidrofóbicas que ingresan a la célula por difusión pasiva (3).

La mayoría de los pacientes con melanoma avanzado reciben terapia sistémica. La terapia estándar es con DTIC, a pesar que la tasa de respuesta es generalmente baja y muy pocos pacientes logran una remisión completa (4). Algunos esquemas que combinan DTIC con agentes "cross-linkantes" (Cisplatino), desestabilizadores de microtúbulos (Vinblastina, Vincristina, Vindesina) e inhibidores de Topoisomerasas (Etopósido, Camptotecina, Irinotecan) han inducido respuestas clínicas en metástasis en hígado, hueso y cerebro, que generalmente no responden a DTIC solo, pero sin producir un impacto significativo en la sobrevida del paciente (5-8).

El DTIC y la temozolomida (TMZ) son pro-drogas del agente citotóxico (5-[3-metil]1-triazen-1-yl-imidazol-4-carboxamida, MTIC). MTIC posee actividad alquilante y actúa específicamente durante la fase S del ciclo celular. Reacciona con átomos nucleofílicos de las bases nucleicas formando puentes inter e intracatenarios en la doble hélice de ADN, provocando interferencias importantes en los procesos de transcripción y replicación. La lesión al ADN más relevante para la efectividad del tratamiento con TMZ es la formación de O6-metilguanina (O6-meG). Esta lesión puede ser reparada a través de la enzima O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT), revirtiendo el apareamiento erróneo de O6-meG con la timina. Los errores en la replicación por el apareamiento guanina-timina (GT) son normalmente corregidos por el sistema de *mismatch repair* (MMR). El proceso de reparación se inicia activando la degradación del ADN mediada por una actividad exonucleasa. Intentos fallidos de reparar estos *mismatches* conducen a la formación de cortes (*nicks*) en el ADN que finalmente resultan en la inducción de apoptosis en la célula. Así, el éxito de la terapia con DTIC/TMZ dependería de una baja actividad de MGMT y del sistema de MMR (9). La expresión de MGMT en melanomas y gliomas es relativamente baja en comparación con otros cánceres. De hecho, la contribución de los niveles de MGMT a la resistencia del melanoma a los agentes alquilantes y metilantes no ha sido todavía claramente establecida (10). La resistencia inducida por MGMT puede ser revertida por la inhibición de la enzima con O6-benzilguanina o por la de-

plección de MGMT tras la exposición a agentes metilantes tales como la estreptozotocina (11). A pesar que estudios preclínicos indicaron que las células de melanoma pretratadas con estreptozotocina para depletar MGMT incrementaron su sensibilidad a Carmustina, en un Ensayo Clínico de Fase II no se demostró una mejora en la sobrevida de los pacientes tratados con esta combinación de drogas, obteniéndose muy baja tasa de respuesta clínica (12).

La vía de reparación de escisión de bases (*base excision repair*, BER) también puede reparar las lesiones generadas por los agentes metilantes. Esta vía de reparación elimina eficientemente los aductos N7-metilguanina, generados en mayor frecuencia que los O6-MeG, por tratamiento con agentes metilantes. Se plantea así que la inhibición de BER podría resultar en un beneficio terapéutico en combinación con el tratamiento con agentes metilantes. PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa) es una enzima central involucrada tanto en la reparación de las rupturas de la cadena de ADN como en la entrada a la apoptosis. Dado que existen evidencias del incremento de la expresión de PARP en los tumores confiriendo quimiorresistencia, se ha investigado en los últimos años el efecto de inhibidores de PARP para revertir la resistencia a TMZ. Uno de estos inhibidores, AG014699 (pro-droga de AG014447) demostró en modelos preclínicos la potenciación de la citotoxicidad de TMZ e Irinotecán. La inhibición de PARP durante la exposición a TMZ evita la reparación de las rupturas en el ADN formadas luego de la escisión de bases, y así dispara la apoptosis. Recientemente en un estudio de Fase I, AG014699 se ha ensayado en combinación con TMZ en 33 pacientes con tumores sólidos, entre ellos el melanoma. La droga fue bien tolerada, sin evidencias de toxicidad significativa, y en todos los pacientes tratados con una dosis de 12 mg/m² se observó inhibición alta (>90%) de la actividad de PARP a las 5 h, tanto en el sitio tumoral como en linfocitos de sangre periférica (13). En un estudio de Fase II AG014699 combinado con 200 mg/m² TMZ se encontraron resultados preliminares interesantes en pacientes con melanoma metastásico, sugiriendo algún beneficio clínico en la potenciación de la quimioterapia (14). Otro inhibidor de PARP, ABT-888 (2-(R)-2-metilpirrolidin-2-yl)-1H-benzimidazol-4-carboxamida), contiene una modificación estructural que confiere una significativa disminución de la actividad enzimática. Se ha demostrado, en modelos de cáncer de mama y melanoma, que esta modificación se traduce en una mejora *in vivo* en la respuesta frente a compuestos citotóxicos como TMZ, carboplatino y ciclofosfamida (15). Este compuesto está siendo ensayado actualmente en pruebas clínicas en pacientes con cáncer.

El cisplatino es una de las drogas antitumorales más activas y más ampliamente utilizadas en el tratamiento del cáncer pero en el caso del melanoma el cisplatino y sus análogos, solo o en combinación con otras drogas, no ha producido resultados satisfactorios. El uso terapéutico de los compuestos de platino está limitado por sus efectos secundarios dosis-dependientes, que incluyen toxicidad renal, mielosupresión, daño neurológico y náuseas severas (16). La ineficacia del cisplatino y sus análogos generalmente puede deberse a una falta de respuesta primaria a la droga o a una resistencia a la droga adquirida por las células tumorales que se desarrolla rápidamente, observada tanto *in vitro* como *in vivo*, y que es la principal responsable de la falla en la terapia. Luego de la entrada del cisplatino a la célula, se forman aductos bifuncionales de platino con las bases

de ADN, reaccionando solamente el 1% del cisplatino intracelular con el ADN nuclear, lo que genera el efecto citotóxico de la droga. La formación de los aductos *per se* puede no ser suficiente para producir la muerte celular, pero la cascada de eventos que llevan a la muerte celular no está aún del todo clara. En general, se acepta que el mecanismo citotóxico primario de los compuestos de platino consiste en la formación de aductos platino-ADN y la posterior inducción de vías de transducción de señales que llevan a la apoptosis celular (16). De hecho, el cáncer testicular de células germinales es uno de los pocos tumores que puede ser curado con quimioterapia, incluyendo el cisplatino, y estas células tumorales carecen del sistema de reparación BER (17).

Los transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) son una gran familia de moléculas que están involucradas en los mecanismos de eflujo activo de drogas y diferentes miembros de esta superfamilia están específicamente relacionados con la resistencia a distintas drogas citotóxicas, dependiendo del tipo de tumor. En el melanoma, la glicoproteína bien conocida ABCB1 (MDR1/glicoproteína-P) no está muy implicada en la resistencia a las drogas. ABCB5 es un miembro de la familia de transportadores, cercano estructuralmente a ABCB1 cuya expresión se ha asociado recientemente con una subpoblación de células de melanoma con propiedades de célula *stem* tumoral, demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* (18). Las células ABCB5+ se encuentran en biopsias de melanoma y la expresión incrementada conferiría resistencia a doxorubicina. Se ha demostrado que si bien existen dos isoformas de ABCB5 (alfa y beta), solamente la inhibición de ABCB5 beta a nivel de ARNm puede inducir sensibilidad a Camptotecin 10-OH, 5-FU (5-fluorouracilo) y mitoxantrona en algunas líneas celulares de melanoma (19).

Entre los mecanismos que confieren resistencia a las drogas anti-tumorales basadas en platino, en el melanoma está la expresión del transportador ABCC2 (MRP2) (20), que expulsa los compuestos de platino hacia afuera de las células y consecuentemente resulta en una reducción de la formación de aductos platino-ADN. El uso clínico de compuestos que inhiben MRP2 *in vitro*, como el MK-57114 o la ciclosporina A, no es posible ya que estos inhibidores son inespecíficos e intrínsecamente tóxicos a las concentraciones efectivas necesarias para su actividad inhibidora. Para bloquear selectivamente el ARNm de MRP2 se han investigado *in vitro* con líneas celulares de melanoma, tanto oligonucleótidos *antisense*, ARN pequeños de interferencia (siRNAs, *small interfering RNAs*) y ribozimas específicas (16) (21). A pesar de los resultados prometedores en cuanto a la reversión de la resistencia a cisplatino tomará unos años aún para que dichas terapias alcancen la etapa clínica.

Resistencia a drogas debida a defectos en las vías de muerte celular

Como se mencionara anteriormente, la resistencia del melanoma a las drogas puede ser en parte explicada por defectos en las células tumorales, que tras la exposición al agente citotóxico no pueden disparar la muerte celular por activación de las vías apoptóticas. Esta conexión final con la apoptosis puede estar impedida por varias alteraciones en las múltiples vías involucradas en la inducción de la apoptosis o la prevalencia de la sobrevida de las células, tales como mu-

taciones en los oncogenes Ras y Braf (22), pérdida del gen supresor PTEN y su control sobre Akt (23), *up*-regulación de Bcl-2 (24) y metilación o pérdida alélica de Apaf-1 (25).

La mayoría de las drogas citotóxicas disparan la muerte celular a través de la activación de una cascada apoptótica que se inicia con la liberación de citocromo C en la mitocondria y la activación de la caspasa 9. La resistencia a la quimioterapia en melanoma se ha atribuido en parte a la sobreexpresión de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica que bloquea la liberación del citocromo C. La reducción o inactivación de Bcl-2, tanto *in vitro* como *in vivo* ha resultado en un incremento de la respuesta a la quimioterapia. Se ha desarrollado una estrategia *antisense* para bloquear específicamente la traducción del ARNm de Bcl-2 a través de un oligonucleótido de 18 bases (Oblimersen) que tras la unión al ARNm media el clivaje del ARN por la enzima RNAsa H. Por tratamiento con Oblimersen se pudo demostrar la *down*-regulación de la proteína Bcl-2 y un incremento de la apoptosis inducida por la quimioterapia *in vitro* y en xenotransplantes de melanoma, por lo que Oblimersen pudo llegar a la etapa clínica (26) (27). En 2006 se publicaron los resultados de un ensayo clínico controlado y randomizado (*The Oblimersen Melanoma Study Group*) conducido para examinar si el pretratamiento con Oblimersen podía incrementar la eficacia del DTIC en 771 pacientes con melanoma metastásico. Los autores reportaron que con un seguimiento mínimo de 24 meses el agregado de Oblimersen DTIC resultó en una tendencia a mayor sobrevida ($p=0,077$), comparada con el tratamiento con DTIC solamente, así como en el incremento significativo de múltiples parámetros clínicos. Asimismo, en pacientes que no poseían la LDH sérica incrementada al inicio del tratamiento la sobrevida total aumentó significativamente. Si bien en la rama Oblimersen-DTIC se incrementó la neutropenia y la trombocitopenia no se observaron eventos serios de sangrado o infecciones (28). Durante los últimos dos años Oblimersen ha sido testeado en combinación con doxorubicina, docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama (29), rituximab para linfoma de células B recurrente no-Hodking (30) y carboplatino y etopósido para cáncer de pulmón de células pequeñas de alto grado (31). En todos estos ensayos de Fase II sólo se observó un efecto modesto en el brazo de combinación con Oblimersen y en algunos casos no fue posible observar una disminución significativa de Bcl-2 en los tumores. Se requieren más estudios para ensayar si esta falta de eficacia se debe a una insuficiente supresión de Bcl-2 *in vivo*.

En un trabajo publicado recientemente se ha propuesto que la resistencia del melanoma al agente alquilante TMZ se debe a un defecto en la señalización hacia la apoptosis resultante de la activación de p53, pero la naturaleza de dichos defectos está todavía bajo estudio (32). Los autores encontraron que las células de melanoma, y no las de linfoma, tratadas con TMZ por 72 h reducían su viabilidad en ensayos de MTT pero no entraban en apoptosis o necrosis. La sensibilidad a TMZ estaba asociada a un arresto del ciclo celular en G2/M (senescencia), con la acumulación de p53 wt y p21; la inhibición de MGMT resultaba a su vez en una menor viabilidad celular. TMZ inducía una mayor senescencia celular en líneas celulares de melanoma con p53 wt que en aquellas donde p53 está mutada. Otro trabajo posterior demostró que en un panel de líneas celulares de melanoma tratadas con TMZ el proceso de apoptosis comenzaba a las 72 h luego del agregado de la droga y que las rupturas en la cadena de ADN se detectaban a tiempos más largos de exposición (120-144 h). Dichas rupturas actuarían como dispa-

dores de la apoptosis inducida por la adición de O⁶-meG en la cadena de ADN. La resistencia a TMZ no se relacionó con el *status* de p53, pero existió una correlación inversa entre la actividad de MGMT y la apoptosis inducida por la droga. La inhibición de MGMT por O⁶-benzilguanina sensibilizó a las células que expresaban MGMT y la transfección de MGMT causó la resistencia a la apoptosis inducida por TMZ (33).

Bioquimioterapia: Combinando la quimioterapia con inmunoterapia

La combinación de diferentes drogas con inmunoterapia (bioquimioterapia) constituye una estrategia que ha sido explotada en ensayos clínicos durante los últimos 20 años, pero la sobrevida total y la tasa de respuestas completas durables no ha mejorado hasta ahora (34-36). La interleukina 2 (IL-2) promueve la proliferación de linfocitos T, la generación de linfocitos citotóxicos (CTLs) y la activación de linfocitos T y B, potenciando la actividad de células *natural killer* (NK). La IL-2 en altas dosis puede lograr el control del melanoma a largo plazo, ya que en el régimen de alta dosis es capaz de producir respuestas durables en el 16% de los pacientes, y lograr respuestas completas en un 6% de ellos (37). También, el interferón alfa (IFN- α 2b) ha demostrado ser activo en combinación con otros agentes contra el melanoma con una tasa de respuesta global del 24% (rango 10-46%) en pacientes con melanoma metastásico no tratados (38). En las estrategias de combinación, la quimioterapia se aplica para disminuir las masas tumorales mientras que la IL-2 se piensa que incrementará los conteos de linfocitos y células NK, mejorará la relación linfocitos CD4+/CD8+ y disminuirá el número de células T regulatorias. En el caso del IFN- α 2b, sin embargo, su mecanismo de acción molecular aún permanece poco claro. En 2008, Kirkwood *et al.* (39) reportaron que en pacientes tratados con IFN- α 2b en alta dosis la señalización de las vías MAPK se regula de manera diferente en las células tumorales de melanoma que las células linfoides del huésped *in vivo*. Los autores analizaron biopsias de los tumores y ganglios linfáticos obtenidas antes y después del tratamiento y encontraron que el IFN- α 2b en alta dosis *down*-regulaba tanto las vías de activación MEK/ERK MAPK y pSTAT3 en células tumorales pero no la vía ERK MAPK en células linfoides. Así, el IFN- α 2b en alta dosis parece afectar *in vivo* la vía MEK/ERK MAPK en células de melanoma. La activación de esta vía es importante para la motilidad de las células tumorales (40) y por lo tanto su *down*-regulación puede ser correlacionada con la inhibición de la metástasis del melanoma.

La bioquimioterapia combinando cisplatino, vinblastina y DTIC (CVD) junto con IL-2 e IFN- α 2b ha demostrado algunos resultados promisorios en ensayos clínicos pequeños y controlados de Fase II (41). Recientemente, se han publicado resultados desalentadores del mayor ensayo de Fase III que comparó la bioquimioterapia concurrente con CVD + IL-2 + IFN- α 2b (BCT) y la terapia CVD solamente en pacientes con melanoma metastásico (E3695). A pesar que la BCT produjo una tasa de respuesta ligeramente mayor y una más prolongada sobrevida libre de progresión que el CVD solo, no se encontró una mejora estadísticamente significativa en la sobrevida total o respuestas durables. Además, se observó mayor toxicidad en la rama BCT comparada con la rama CVD (95% *versus* 20% toxicidad grado 3 o peor), de modo que se ha concluido que la BCT no debe ser

recomendada para pacientes con melanoma metastásico (5).

También se han ensayado combinaciones de IFN- α 2b con TMZ (42), talidomida (43) y talidomida + radioterapia (44) sin impacto significativo en la sobrevida.

Las fallas en estos estudios clínicos hace evidente que todavía hay varios aspectos que deben ser investigados para establecer una base racional a los tratamientos de combinación. Por ejemplo, es posible que la administración conjunta de IL-2 y quimioterapia pueda abolir los efectos inmunoterapéuticos durables de la IL-2, ya que se han observado remisiones completas con altas dosis de IL-2 en alrededor del 15% de los pacientes que no habían respondido a BCT (45). También con el uso de IL-2 y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos) se logró una mayor sobrevida libre de enfermedad y sobrevida total luego de un régimen de BCT (46).

La mayoría de las investigaciones en quimioterapia y radioterapia se han desarrollado sin tener en cuenta la contribución del sistema inmune en los mecanismos de eliminación del tumor, ya que las estrategias se validaron en la mayoría de los casos en modelos de xenotransplantes humanos en ratones inmunoincompetentes. Esta estrategia está cambiando ya que hay creciente volumen de evidencias que indican que existe una interacción agonista entre las drogas citotóxicas y el sistema inmune, donde ambas partes contribuyen a la muerte de las células tumorales (revisado detalladamente en 47). Muchas de las estrategias que se usan en la clínica actualmente pueden suprimir la respuesta inmune contra los tumores tales como la remoción quirúrgica de los ganglios drenantes de los tumores y/o la eliminación de efectores citotóxicos inducida por la quimioterapia. Ya que la mayoría de las drogas quimioterápicas ejercen su efecto antitumoral mediante la inducción de apoptosis, se cree que la muerte de las células tumorales no se asocia a la inflamación y que por lo tanto el proceso no es inmunogénico. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que algunos agentes quimioterápicos y esquemas de radioterapia pueden producir una muerte de las células tumorales "inmunogénica", mediante el incremento de la expresión de moléculas MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) antígenos tumorales y receptores de muerte. Por ejemplo, HMGB1 (*high-mobility group box 1 protein*) es una proteína nuclear que es liberada por células tumorales moribundas durante las fases tardías de la apoptosis que se une al receptor TLR4 en las células dendríticas, promoviendo el procesado y la presentación antigénica (48). Además, algunas drogas pueden impactar en el sistema inmune ya sea modulando subpoblaciones de linfocitos inmunosupresores, como la ciclofosfamida (49) o estimulando efectores inmunes como la gemcitabina (50) (51).

Los tratamientos futuros deberían consistir en una estrategia más personalizada en la cual se evaluaran de una manera integrada las características del tumor, el estado del sistema inmune (capacidad de activación/ grado de inmunosupresión) y características intrínsecas del paciente, tal como polimorfismos y mutaciones que puedan influenciar la eficacia terapéutica.

CORRESPONDENCIA

DRA. MARCELA MARÍA BARRIO
Centro de Investigaciones Oncológicas
Fundación Cáncer
Zabala 2836, 1426 Capital Federal
E-mail: barrio.marcela@gmail.com

Referencias bibliográficas

- American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. Atlanta: American Cancer Society, 2008.
- Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2.621 patients. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5426-34.
- La Porta CA. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr Med Chem* 2007; 14: 387-91.
- Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer* 2004; 40: 1825-36.
- Atkins MB, Hsu J, Lee S, Cohen DI, Flaherty LE, Sosman JA, *et al.* Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5748-54.
- Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, *et al.* Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen *versus* dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2745-51.
- Lens MB, Eisen TG. Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 2205-11.
- Lawson DH. Update on the systemic treatment of malignant melanoma. *Semin Oncol* 2004; 31: 33-7.
- Boeckmann L, Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Kuschal C, *et al.* Modulation of the efficacy of temozolomide and dacarbazine melanoma treatment by DNA-repair factors *in vivo* and *in vitro*. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009; 47: 33-5.
- Chen JM, Zhang YP, Wang C, Sun Y, Fujimoto J, Ikenaga M, *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1503-7.
- Dolan ME, Mitchell RB, Mummert C, Moschel RC, Peqq AE. Effect of O6-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Res* 1991; 51: 3367-72.
- Smith DC, Gerson SL, Liu L, Donnelly S, Day R, Trump DL, *et al.* Carmustine and streptozocin in refractory melanoma: an attempt at modulation of O-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1129-34.
- Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, *et al.* Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AGO14699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7917-23.
- Plummer ER LP, Evans J, Steven M, Middleton R, Wilson R, Snow K, *et al.* First and Final report of a phase II study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AGO14699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM). *J Clin Oncol* 2006; 24: 456s.
- Penning TD, Zhu GD, Gandhi VB, Gong J, Liu X, Shi Y, *et al.* Discovery of the Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2009; 52: 514-23.
- Materna V, Liedert B, Thomale J, Lage H. Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer* 2005; 115: 393-402.
- Masters JR, Koberle B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 517-25.
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008; 451: 345-9.
- Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbadioru C, Shankavaram V, Dai Z, *et al.* Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 2004; 64: 4294-301.
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawade T, Kawakami M, *et al.* A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996; 56: 4124-9.
- Koike K, Kawabe T, Tanaka T, Toh S, Uchiuni T, Wada M, *et al.* A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 5475-9.
- Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG, *et al.* Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 154-60.
- Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugan S, Robertson GP, *et al.* Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 2881-90.
- Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, *et al.* The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 333-40.
- Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, *et al.* Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-11.
- Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Dryan RN, van Elsas A, *et al.* bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* 1998; 4: 232-4.
- Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12: 193-213.
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, *et al.* Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4738-45.
- Rom J, von Minckwitz G, Eiermann W, Sievert M, Schlehe B, Marmé F, *et al.* Oblimersen combined with docetaxel, adriamycin and cyclophosphamide as neo-adjuvant systemic treatment in primary breast cancer: final results of a multicentric phase I study. *Ann Oncol* 2008; 19: 1698-705.
- Pro B, Leber B, Smith M, Fayad L, Romaguera J, Hagemeyer F, *et al.* Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 143: 355-60.
- Rudin CM, Salgia R, Wang X, Fayad L, Romaguera J, Hagemeyer F, *et al.* Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30103. *J Clin Oncol* 2008; 26: 870-6.
- Mhaidat NM, Zhang XD, Allen J, Avery-Kiejda KA, Scott RJ, *et al.* Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *Br J Cancer* 2007; 97: 1225-33.
- Naumann SC, Roos WP, Jost E, Belohlaverk C, Lennerz V, Schmidt CW, *et al.* Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related

- to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer* 2009; 100: 322-33.
34. Atkins MB, O'Boyle KR, Sosman JA, Weiss GR, Margolin KA, Ernest ML, *et al.* Multiinstitutional phase II trial of intensive combination chemoimmunotherapy for metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1553-60.
 35. Keilholz U, Goey SH, Punt CJ, Proebstle TM, Salzman R, Scheibenbagen L, *et al.* Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2579-88.
 36. Richards JM, Gale D, Mehta N, Lestingi T. Combination of chemotherapy with interleukin-2 and interferon alfa for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 651-7.
 37. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, *et al.* Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994; 271: 907-13.
 38. Hernberg M, Pyrhonen S, Muhonen T. Regimens with or without interferon-alpha as treatment for metastatic melanoma and renal cell carcinoma: an overview of randomized trials. *J Immunother* 1999; 22: 145-54.
 39. Wang W, Edington HD, Jukic DM, Rao UN, Land SR, Kirkwood JM. Impact of IFNalpha2b upon pSTAT3 and the MEK/ERK MAPK pathway in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1315-21.
 40. Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 2003; 4: 67-79.
 41. Recchia F, Candeloro G, Necozone S, Fumagalli L, Bratta M, Rea S, *et al.* Multicenter phase II study of chemoimmunotherapy in the treatment of metastatic melanoma. *Anti-cancer Drugs* 2008; 19: 201-7.
 42. Hwu WJ, Panageas KS, Menell JH, Lamb LA, Aird S, Krown SE, *et al.* Phase II study of temozolomide plus pegylated interferon-alpha-2b for metastatic melanoma. *Cancer* 2006; 106: 2445-51.
 43. Hwu WJ, Krown SE, Menell JH, Panageas KS, Merrell J, Lamb LA, *et al.* Phase II study of temozolomide plus thalidomide for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3351-6.
 44. Atkins MB, Sosman JA, Agarwala S, Logan T, Clark JI, Ernstoff MS, *et al.* Temozolomide, thalidomide, and whole brain radiation therapy for patients with brain metastasis from metastatic melanoma: a phase II Cytokine Working Group study. *Cancer* 2008; 113: 2139-45.
 45. Tarhini AA, Kirkwood JM, Gooding WE, Cai C, Agarwala SS. Durable complete responses with high-dose bolus interleukin-2 in patients with metastatic melanoma who have experienced progression after biochemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3802-7.
 46. O'Day SJ, Boasberg PD, Piro L, Kristedja TS, Wang HJ, Martin M, *et al.* Maintenance biotherapy for metastatic melanoma with interleukin-2 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves survival for patients responding to induction concurrent biochemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2775-81.
 47. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 59-73.
 48. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13: 1050-9.
 49. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004; 34: 336-44.
 50. Levitt ML, Kassem B, Gooding WE, Miketic LM, Landreneau RJ, Ferson PF, *et al.* Phase I study of gemcitabine given weekly as a short infusion for non-small cell lung cancer: results and possible immune system-related mechanisms. *Lung Cancer* 2004; 43: 335-44.
 51. Plate JM, Plate AE, Shott S, Bograd S, Harris JE. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 915-25.

Aceptado para su publicación el 25 de septiembre de 2009