

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche



Corso di Laurea Magistrale in CTF

Tesi sperimentale:

*Metformina: un farmaco antidiabetico in grado di
contrastare la chemioresistenza di cellule di
melanoma umano metastatico*

Relatore:

Prof.ssa Barbara Marengo

Correlatore:

Prof.ssa Cinzia Maria Domenicotti

Candidata:

Alessia Orlando

Anno Accademico 2024-2025

*A Rosa e Gianni,
sempre con me, in ogni passo.*

Come promesso.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia Relatrice, la Prof.ssa Barbara Marengo, per la fiducia dimostrata, per i suoi preziosi insegnamenti e per avermi fatto avvicinare al mondo della ricerca. La ringrazio per aver saputo alleggerire le giornate di laboratorio con la sua spensieratezza e per avermi spronata a non mollare mai, anche nei momenti di incertezza. Ringrazio inoltre la mia Correlatrice, la Prof.ssa Cinzia Domenicotti per la sua gentilezza, per la serenità che è riuscita a trasmettermi e per il supporto fondamentale.

A mia mamma e mio papà, il grazie più profondo. Siete la mia fonte di ispirazione ogni giorno della mia vita. Senza di voi, senza i vostri sacrifici e la vostra pazienza, non sarebbe stato possibile raggiungere questo importante traguardo. Grazie per credere sempre in me, anche quando non ci credo io.

Ringrazio nonna Rosa e nonno Gianni che, anche se non sono più qui a festeggiare con me, mi accompagnano con il loro ricordo in ogni istante della mia vita. Grazie per avermi trasmesso, con la vostra gentilezza e semplicità, il valore delle piccole cose. Spero, con questo traguardo, di avervi reso orgogliosi di me.

Ringrazio inoltre i nonni Ricco e Cocca per l'affetto dimostratomi negli anni e per aver condiviso con me i momenti importanti della mia vita. Un ricordo particolare va a nonno Ricco, che porto nel cuore in questo giorno così importante.

Un ringraziamento speciale va ad Alessio, che dopo sei lunghi anni passati a sopportarmi tra libri e momenti di stress, meriterebbe una laurea anche lui. Grazie per la tua pazienza, per aver creduto in me ogni singolo giorno e per essere stato la spalla su cui ho potuto sempre contare. Grazie per esserci, semplicemente.

Un grazie immenso a Martina per essere la parte irrazionale della mia vita; con le tue pazzie mi hai regalato momenti di spensieratezza anche quando lo studio rischiava di sotterrarmi; senza di te questo percorso sarebbe stato decisamente più grigio.

Un ringraziamento speciale alle mie dolci amiche e colleghe Ale A., Chia R., Sere e Chia B., insostituibili compagne di pranzi e confidenze. Grazie alla vostra presenza sono riuscita a vivere questo percorso con una spensieratezza che non avrei mai pensato di ritrovare.

Ringrazio Otta, molto più di una semplice coinquilina, per avermi aperto le porte di casa e del cuore. Grazie per la tua infinita dolcezza e per avermi spronata a non mollare mai.

Ringrazio Ale F. e Marta, amiche e colleghe di università dal primo giorno; grazie per aver condiviso con me ogni chilometro di questo percorso e per i momenti passati insieme tra chiacchiere in treno, aperitivi e poke al mare.

Ringrazio Luna, per aver condiviso con me ogni aspetto di questo percorso, dei pranzi in università, alle cene improvvisate, ai momenti di svago.

Vorrei poi ringraziare Anna, per avermi dimostrato che certi legami sono destinati a non spezzarsi mai; vederti al mio fianco oggi, come se quattro anni di silenzio non ci fossero mai stati, mi riempie il cuore di gioia.

Grazie a Costanza, amica fin dai tempi del liceo, per aver condiviso con me serate tra tisane calde e chiacchiere; sei stata il rifugio dove ritrovare me stessa lontano dai libri e dalla frenesia dello studio.

Ringrazio Sarina, Anxhela e Ale C., che nonostante abbiano concluso il loro percorso, hanno continuato a condividere con me una parte fondamentale di questo viaggio.

Infine, vorrei ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine in questo percorso anche solo con una semplice chiacchierata. Grazie a chi ha saputo ascoltarmi, a chi mi ha regalato un sorriso. Ognuno di voi ha contribuito a rendere questo traguardo ancora più speciale.

RIASSUNTO

Il melanoma metastatico, caratterizzato dalla mutazione BRAF V600E, è una tra le neoplasie più letali a causa della sua spiccata aggressività. L'identificazione di tale mutazione ha portato allo sviluppo della *Target Therapy*, di cui il vemurafenib (PLX4032) è tra i capostipiti. Sebbene i pazienti traggano inizialmente beneficio da tale trattamento, entro pochi mesi dall'inizio della terapia, sviluppano chemioresistenza, un processo multifattoriale in cui la riprogrammazione metabolica gioca un ruolo cruciale. A tale riguardo, studi precedentemente condotti dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto la tesi hanno dimostrato che il metabolismo ossidativo svolge un ruolo importante nell'insorgenza della resistenza del melanoma al PLX4032. Pertanto, modulatori del metabolismo ossidativo, come la metformina, farmaco utilizzato nel trattamento del diabete di tipo II, potrebbero essere di ausilio nella terapia.

Sulla base di tali premesse, scopo del lavoro di tale tesi è stato quello di valutare se la modulazione metabolica indotta dalla metformina possa essere efficace nel contrastare la chemioresistenza al vemurafenib. Il modello cellulare utilizzato era costituito da cellule di melanoma metastatico resistenti al vemurafenib (MeOV-PLX-R) precedentemente selezionate presso il laboratorio in cui è stato condotto tale lavoro di tesi.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento combinato con PLX4032 e metformina riduce marcatamente la vitalità e la clonogenicità delle cellule MeOV-PLX-R, confermando l'importanza di un efficiente metabolismo ossidativo nel mantenimento della chemioresistenza. Inoltre, è stato osservato che l'attività sinergica di PLX4032 + metformina è potenzialmente correlata a meccanismi mediati dall'ossidazione, come dimostrato dall'incremento della perossidazione lipidica.

Nel complesso, i dati ottenuti evidenziano come la riprogrammazione metabolica rappresenti un target terapeutico promettente e suggeriscono che la metformina possa essere un valido ausilio per superare la chemioresistenza al vemurafenib. Pertanto, sebbene in vitro, tali risultati suggeriscono che l'associazione di metformina con inibitori di BRAF potrebbe rappresentare un campo di indagine per future ricerche cliniche. Inoltre, essendo entrambi farmaci già utilizzati nella clinica, l'eventuale nuovo impiego in studi clinici combinati potrebbe essere facilitato rispetto alla sperimentazione di molecole totalmente nuove.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1. IL MELANOMA	1
1.1. Epidemiologia	3
1.1.1. Fattori demografici e sedi di insorgenza	4
1.1.2. Sottotipi istologici.....	5
1.2. Eziologia e fattori di rischio	6
1.2.1. Esposizione a raggi UV	7
1.2.2. Fattori fenotipici	8
1.2.3. Comorbidità	8
1.3. Patogenesi: alterazioni genetiche	9
1.3.1. Vie di trasduzione del segnale coinvolte nella crescita cellulare	10
<i>BRAF</i>	10
<i>NRAS</i>	11
<i>KIT</i>	11
<i>PTEN</i>	12
1.3.2. Regolazione del ciclo cellulare	13
<i>Locus CDKN2A</i>	14

<i>TP53, MDM2/4, p14ARF</i>	14
<i>Cicline</i>	15
1.3.3. Mutazioni dei geni coinvolti nella pigmentazione	15
<i>MC1R</i>	15
<i>MITF</i>	16
1.3.4. Classificazione molecolare.....	17
1.3.5. Correlazione istologia-mutazioni.....	18
1.4. Diagnosi	19
1.5. Terapia	23
1.5.1. Terapia chirurgica e valutazione linfonodale	23
1.5.2. Terapia neoadiuvante	25
1.5.3. Terapia della malattia “in transit” non resecabile	26
1.5.4. Terapia adiuvante.....	27
<i>I. Immunoterapia</i>	28
I.I. Citochine.....	28
I.II. Inibitori dei <i>checkpoint</i> immunitari.....	30
<i>II. Targeted therapies</i>	31
II.I. Inibitori di BRAF.....	31
II.II. Inibitori di MEK.....	32
1.5.5. Radioterapia.....	34

1.5.6. Chemioterapia tradizionale	35
I. Agenti Alchilanti.....	35
II. Agenti che interferiscono con i microtubuli	36
III. Composti del Platino	36
IV. Antracicline.....	37
1.5.7. Terapia della malattia metastatica (stadio IV).....	37
1.6. Chemioresistenza	39
1.6.1. Resistenza intrinseca	40
1.6.2. Resistenza estrinseca	40
1.6.3. Meccanismi di chemioresistenza	42
I. Evasione dall'apoptosi.....	42
II. Alterazioni delle vie di trasduzione del segnale	43
III. Epigenetica	45
IV. <i>Switching</i> fenotipico.....	46
V. Alterazione metabolica	47
VI. Microambiente tumorale	48
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	50
3. MATERIALI E METODI.....	54
3.1. Sostanze chimiche	54

3.2. Linee cellulari	54
3.3. Trattamenti	55
3.4. Saggio di vitalità (MTS)	55
3.5. Clonogenicità.....	56
3.6. Perossidazione lipidica (LPO).....	57
3.7. Analisi statistica.....	58
4. RISULTATI.....	59
4.1. Il trattamento combinato con PLX4032 e metformina riduce marcatamente la vitalità delle cellule PLX- resistenti	59
4.2. Il trattamento combinato potenzia l'effetto lipoperossidativo del PLX4032 e della metformina.	61
4.3. Il trattamento con metformina da sola o in associazione con PLX4032 diminuisce la clonogenicità delle cellule MeOV-PLX-R.....	62
5. DISCUSSIONE	64
6. BIBLIOGRAFIA	69

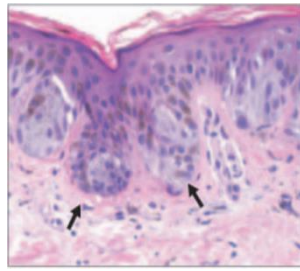
1. INTRODUZIONE

1. IL MELANOMA

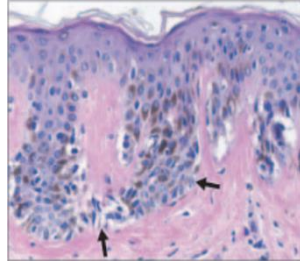
Il melanoma è una neoplasia altamente aggressiva che origina dalla trasformazione dei melanociti (Newcomer K et al., 2022) e la cui incidenza è in costante aumento in tutto il mondo (Switzer B et al., 2022). I melanociti sono cellule specializzate nella sintesi di melanina e sono principalmente localizzate nella pelle, ma anche negli occhi, nelle orecchie, nelle leptomeningi, nel tratto gastrointestinale e nelle mucose orali, genitali e sinusali; pertanto il melanoma può insorgere in ognuno di questi distretti anatomici (Long GV et al., 2023).

La pericolosità della patologia risiede nella spiccata propensione alla metastatizzazione (fig. 1); infatti, a differenza della maggior parte dei tumori solidi, anche un melanoma primario T1 di dimensioni submillimetriche può già possedere un potenziale metastatico (Tímár J et al., 2022).

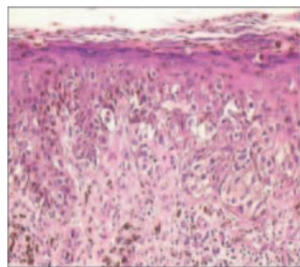
Pertanto, mentre una lesione localizzata e diagnosticata in fase precoce è spesso risolvibile tramite escissione chirurgica, una crescita verticale di pochi millimetri è sufficiente ad incrementarne drasticamente la letalità della malattia (Newcomer K et al., 2022; fig. 1).



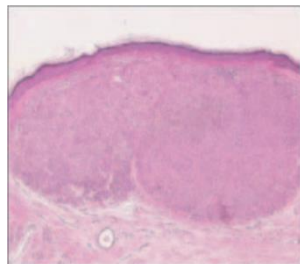
i. Proliferazione dei melanociti strutturalmente normali che porta alla formazione del nevo benigno; istologicamente, si osserva un numero aumentato di melanociti annidati lungo lo strato basale (freccie).



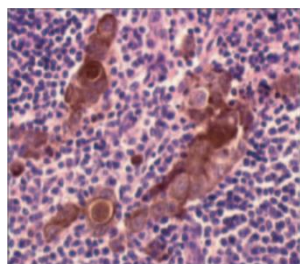
ii. Sviluppo di una crescita aberrante che può verificarsi all'interno di un nevo preesistente o in una nuova sede; istologicamente, le lesioni presentano atipie citologiche casuali e discontinue (freccie).



iii. Crescita radiale per cui le cellule acquisiscono la capacità di proliferare a livello intraepidermico; le lesioni sono clinicamente rilevate e mostrano un cancro citomorfologico esteso all'intera lesione.



iv. Le lesioni progrediscono verso la fase di crescita verticale e acquisiscono la capacità di invadere il derma formando un nodulo espansivo.



v. Diffusione delle cellule in altre aree della pelle ed in altri organi dove possono proliferare e creare un focolaio metastatico.

Figura 1. Progressione del melanoma.

I melanociti progrediscono attraverso una serie di fasi verso la trasformazione maligna. La frequenza con cui si instaura la progressione dei nevi verso la malignità o la regressione dei nevi è difficile da determinare (Miller AJ et al., 2006).

1.1. Epidemiologia

Il melanoma cutaneo (MSC) rappresenta la maggior parte delle diagnosi di melanoma (>90%) e si distingue dagli altri tumori cutanei “non melanoma” (NMSC). Le forme di melanoma di origine mucosale e uveale si verificano più raramente con un’incidenza inferiore <1-5% (Long GV et al., 2023; Ciążyńska M et al., 2021). L’incidenza del melanoma cutaneo è in costante aumento sin dagli anni '50 nelle popolazioni caucasiche (Switzer B et al., 2022), fenomeno strettamente correlato ai cambiamenti negli stili di vita ed alla conseguente maggiore esposizione ai raggi UV sia di origine solare naturale sia artificiale (Cust AE et al., 2011; Chang C et al., 2014).

Le statistiche di sopravvivenza riflettono l'importanza della diagnosi precoce; infatti, una diagnosi tempestiva è associata ad una sopravvivenza globale a 5 anni pari al 92% (Newcomer K et al., 2022). Tuttavia, nonostante i recenti miglioramenti nella chemioterapia e nell’immunoterapia, la malattia avanzata rimane mortale e la sopravvivenza globale dei pazienti a 5 anni corrisponde al 19% (Miller KD et al., 2019).

Negli ultimi 10 anni sono stati fatti importanti progressi nei trattamenti sistemici, in particolare grazie allo sviluppo di terapie mirate e immunoterapiche per la malattia metastatica (Newcomer K et al., 2022). La disponibilità di terapie sistemiche efficaci ha portato a rapidi

miglioramenti della sopravvivenza e ad una significativa evoluzione degli approcci tradizionali alla gestione di questa patologia (Newcomer K et al., 2022).

1.1.1. Fattori demografici e sedi di insorgenza

A differenza di altri tumori solidi, il melanoma colpisce principalmente persone giovani o di mezza età. Al momento della diagnosi, l'età media è di 57 anni e l'incidenza aumenta linearmente dopo i 25 anni fino ai 50 anni, per poi rallentare soprattutto nelle donne (Rastrelli M et al., 2014).

Il rapporto tra incidenza e genere biologico è complesso ed è strettamente correlato all'età: fino ai 40 anni il tasso di incidenza del melanoma è maggiore nelle donne, mentre intorno ai 75 anni, risulta quasi 3 volte superiore negli uomini rispetto alle donne (Rigel DS et al., 2010; MacKie RM et al., 2009).

Anche la sede anatomica di insorgenza dipende dal sesso: negli uomini il melanoma si localizza principalmente a livello della schiena, mentre nelle donne insorge più comunemente a livello delle braccia e delle gambe (Markovic SN et al., 2007).

Il tasso di incidenza del MSC varia ampiamente anche in relazione all'etnia. La popolazione caucasica, infatti, ha un rischio circa 10 volte

maggiore di sviluppare la malattia rispetto alle popolazioni di colore, asiatiche o ispaniche (Lasithiotakis K et al., 2006).

1.1.2. Sottotipi istologici

In base alle caratteristiche cliniche e istopatologiche, il melanoma viene classificato in diversi sottotipi principali (Rastrelli M et al., 2014):

- *Melanoma a diffusione superficiale (SSM)*: è la variante più comune e rappresenta circa il 70% dei casi totali. È correlato all'esposizione solare intermittente e si localizza più spesso sulla parte posteriore degli arti inferiori nelle donne e sul dorso negli uomini (Markovic SN et al., 2007);
- *Melanoma nodulare (NMM)*: rappresenta il 5% dei melanomi e si manifesta più spesso sul tronco e sugli arti dei pazienti tra i 50 e i 60 anni, con una prevalenza maschile. La crescita è soltanto verticale e questo spiega l'alto tasso di metastasi e la frequente ulcerazione (Markovic SN et al., 2007);
- *Melanoma lentigo maligna (LMM)*: costituisce il 4%-15% dei melanomi cutanei ed è correlato all'esposizione solare a lungo termine e all'età avanzata (Markovic SN et al., 2007). Si sviluppa quasi esclusivamente sulle aree foto-esposte, in particolare testa e collo (Duncan LM, 2009);

- *Melanoma lentiginoso acrale (ALM)*: rappresenta il 5% dei melanomi nella popolazione caucasica ed è il sottotipo più frequente nelle popolazioni asiatiche, ispaniche e africane. Colpisce prevalentemente le estremità, in particolare la cute glabra dei palmi delle mani, delle piante dei piedi e il letto ungueale. È tipico dei pazienti anziani, con una lieve prevalenza nel sesso femminile (Markovic SN et al., 2007);
- *Melanoma desmoplastico (DM)*: insorge solitamente tra i 60 e i 70 anni ed interessa soprattutto testa e collo (Markovic SN et al., 2007).

1.2. Eziologia e fattori di rischio

Il melanoma può originare *de novo* oppure evolvere da nevi preesistenti, sebbene il tasso di trasformazione maligna di questi ultimi sia statisticamente basso (Tímár J et al., 2022).

I fattori di rischio che predispongono allo sviluppo del melanoma sono numerosi. Tra quelli di maggior rilievo si annoverano: l'aumento dell'esposizione ai raggi UV, il contatto con determinate sostanze chimiche, il fumo di sigaretta (Gordon R, 2013), le infezioni cutanee sostenute da batteri opportunisti (Nazir S et al., 2021) e fattori fenotipici individuali (Newcomer K et al., 2022).

1.2.1. Esposizione a raggi UV

Il principale fattore di rischio ambientale è rappresentato dall'esposizione intensa e intermittente ai raggi UV (Newcomer K et al., 2022). La radiazione UV responsabile del danno cutaneo proviene principalmente dalle radiazioni UVA (315-400 nm) e UVB (280-315 nm). La radiazione UVA rappresenta circa il 95% della radiazione UV solare e rappresenta la principale fonte di radiazione nei lettini abbronzanti. Gli UVA, interagendo con il DNA, inducono la formazione di dimeri di timina e possono anche causare danno ossidativo indiretto al DNA (Douki T et al., 2003). La mutazione puntiforme caratteristica del danno da radiazioni UV è la transizione C → T (Brash DE et al., 1991). La radiazione UVB, che è invece assorbita direttamente dalle macromolecole del DNA, causa principalmente danni attraverso la ciclo-dimerizzazione della pirimidina, che spesso colpisce i residui di timina adiacenti (Shah P et al., 2015).

È ormai accertato che qualsiasi esposizione a sorgenti artificiali di radiazioni UV, come i lettini abbronzanti, comporti un aumento misurabile del rischio di sviluppare melanoma, contrariamente a quanto ipotizzato in passato (Int J Cancer, 2007).

Inoltre, è stato anche dimostrato che l'esposizione agli UV è in grado di indurre alterazioni epigenetiche che contribuiscono ai processi di trasformazione neoplastica (Sabit H et al., 2020).

1.2.2. Fattori fenotipici

I fattori fenotipici più importanti associati allo sviluppo del melanoma includono la pigmentazione cutanea, determinata dalla sintesi di eumelanina o feomelanina, e la presenza o assenza di nevi melanocitici (Newcomer K et al., 2022).

Un fenotipo caratterizzato da pigmentazione a predominanza di feomelanina (carnagione più chiara, occhi azzurri e capelli rossi) è associato ad una maggiore incidenza di scottature solari, accompagnate dalla formazione di vesciche, che correla con un aumentato rischio di melanoma (Newcomer K et al., 2022).

Inoltre, il rischio di sviluppare un melanoma è correlato ad anamnesi personale positiva per neoplasie cutanee o extra-cutanee (Newcomer K et al., 2022).

1.2.3. Comorbidità

I pazienti sopravvissuti ad un tumore in età pediatrica che sviluppano un melanoma presentano una maggiore probabilità di morte rispetto ai pazienti con melanoma primario (Brown AL et al., 2019). Oltre ai tumori pediatrici, anche alcune neoplasie ematologiche dell'adulto, come la leucemia linfatica cronica (Olsen CM et al., 2016) o il linfoma non-Hodgkin (Lam CJ et al., 2015), sono associate ad un aumentato rischio di sviluppo di melanoma, probabilmente a causa dell'alterazione

della normale funzione immunitaria (Newcomer K. et al., 2022). Infatti il melanoma è un tumore immunogenico, pertanto, condizioni caratterizzate da alterazioni del sistema immunitario sono associate ad incremento del rischio di malattia (Newcomer K et al., 2022). In particolare è stato osservato un rischio aumentato nei soggetti sottoposti a trapianto di organi solidi (Robbins HA et al., 2015; D'Arcy ME et al., 2019) e a trapianto di cellule staminali emopoietiche (Omland SH et al., 2016).

1.3. Patogenesi: alterazioni genetiche

Tra le neoplasie umane il melanoma presenta uno dei carichi mutazionali più elevati, caratteristica che riflette la sua stretta correlazione con il danno a carico del DNA indotto da fattori ambientali, in particolare dalle radiazioni UV (Lawrence MS et al., 2013). Il complesso panorama mutazionale rende necessaria la distinzione tra mutazioni *driver*, funzionalmente rilevanti per l'oncogenesi e mutazioni *bystander*, prive di un ruolo causale diretto nella progressione tumorale (Newcomer K et al., 2022).

Dal punto di vista molecolare, la patogenesi del melanoma è riconducibile a tre principali categorie di alterazioni genetiche: i) mutazioni *driver* a carico dei geni che codificano proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella crescita e sopravvivenza

cellulare; ii) alterazioni dei meccanismi di regolazione del ciclo cellulare; iii) mutazioni a carico dei geni coinvolti nella pigmentazione.

1.3.1. Vie di trasduzione del segnale coinvolte nella crescita cellulare

La patogenesi molecolare del melanoma è dominata dall'iperattivazione di due vie di segnalazione intracellulare: la via della proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK) e la via della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K)/AKT. In condizioni fisiologiche la maggior parte dei fattori di crescita esterni attiva queste cascate legandosi ai recettori tirosin-chinasi (RTK) presenti sulla membrana cellulare. Nel melanoma, tuttavia, mutazioni specifiche permettono l'attivazione costitutiva di queste vie indipendentemente dalla presenza o assenza di stimoli recettoriali (Newcomer K et al., 2022; Reddy BY et al., 2017).

BRAF

I melanomi cutanei caratterizzati dalla mutazione di BRAF sono strettamente associati a un'esposizione solare intermittente e intensa, soprattutto in giovane età, e ad una maggiore presenza di nevi melanocitici (Maldonado JL et al., 2003). Il gene BRAF è il più frequentemente mutato nei melanomi (50%). La mutazione tipica è la V600E (esone 15/codone 600), in cui la Valina in posizione 600 è sostituita

da acido glutammico, che determina l'attivazione costitutiva della via MAPK indipendentemente dai segnali recettoriali (Davies H et al., 2002; fig. 2). Altre mutazioni a carico di BRAF che comportano una transizione C → T riconducibile ai raggi UVB sono V600K, V600R e L597S (Hodis E et al., 2012).

Grazie al suo ruolo centrale nelle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella proliferazione cellulare, BRAF^{V600E} è un importante bersaglio terapeutico per il trattamento del melanoma (Zhang T et al., 2016).

NRAS

È un oncogene che risulta essere mutato in circa il 20% dei melanomi, prevalentemente nell'esone 3/codone 61 e le mutazioni più frequenti sono Q61L e Q61R (Hodis E et al., 2012). Tale proteina agisce a monte di BRAF e attiva contemporaneamente sia la via MAPK-dipendente che la via PI3K/AKT, contribuendo a promuovere la proliferazione e sopravvivenza cellulare (Newcomer K et al., 2022; Doma V et al., 2020; fig. 2).

KIT

Nei melanociti e quindi anche nel melanoma, il recettore KIT attiva una via di trasduzione del segnale che coinvolge NRAS e BRAF, responsabile, a sua volta, dell'attivazione di MITF (Microphthalmia-

associated Transcription Factor), fattore di trascrizione specifico dei melanociti (Tímár J et al., 2022). Mutazioni a carico di KIT, prevalentemente la V559A, sono presenti in meno del 15% dei melanomi cutanei totali ma sono particolarmente comuni nei sottotipi acrali e mucosi, dove BRAF e NRAS sono solitamente *wild-type* (Hodis E et al., 2012; Tímár J et al., 2022; Carvajal RD et al., 2011; Doma V et al., 2020).

PTEN

Le mutazioni inattivanti dell'oncosoppressore PTEN portano all'iperattivazione della via AKT-dipendente a causa dell'accumulo di PIP3 (fig. 2). L'attivazione di AKT, coordinata con il complesso mTOR, promuove fortemente la sopravvivenza e la crescita cellulare, rendendo queste vie iperattive nella quasi totalità dei melanomi (Newcomer K et al., 2022).

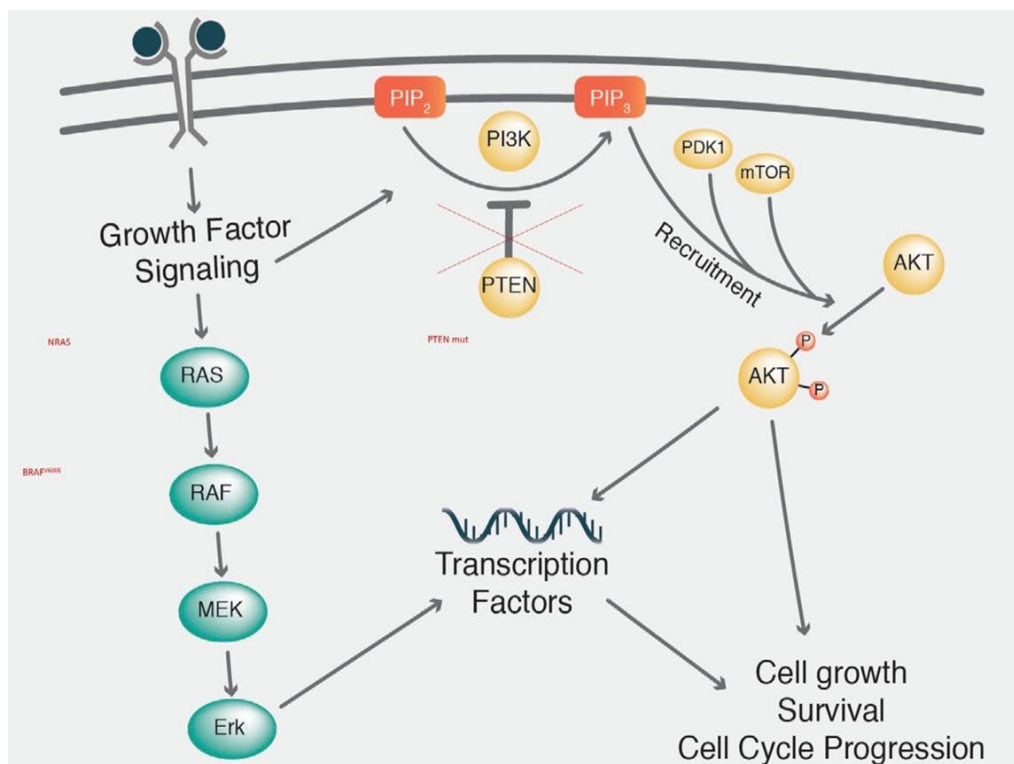


Figura 2. Oncoproteine che promuovono la crescita cellulare del melanoma.

In verde è evidenziata la via di trasduzione del segnale MAPK-dipendente ed in giallo quella AKT-dipendente. Varianti di BRAF e NRAS sono in grado di funzionare anche in assenza di stimoli esterni ed attivare la via di segnalazione di MAPK. L'inattivazione di PTEN causa l'accumulo di PIP₃ che attraverso il reclutamento di AKT promuove la crescita cellulare (Newcomer K et al., 2022).

1.3.2. Regolazione del ciclo cellulare

La progressione neoplastica dipende anche dall'alterazione delle vie molecolari coinvolte nella progressione e nell'arresto del ciclo cellulare, come si osserva in circa il 90%-100% dei melanomi (Bartkova J et al., 1996; Bennett DC, 2008).

Locus CDKN2A

La mutazione a carico del locus CDKN2A è tra le più frequenti ed implica, nella maggior parte dei casi, la delezione del gene (Karimkhani C et al., 2017) con conseguente perdita della funzione oncosoppressiva e la successiva espansione clonale (Shitara D et al., 2015; Lozada JR et al., 2019). Tale gene codifica per 2 oncosoppressori che regolano la crescita cellulare: p16INK4a che inibisce CDK4/6 controllando la transizione G1-S e p14ARF che protegge p53 dalla degradazione (Newcomer K et al., 2022).

TP53, MDM2/4, p14ARF

Mutazioni a carico di TP53, MDM2/4 e p14ARF, proteine coinvolte nell'arresto del ciclo cellulare, determinano una progressione incontrollata nel ciclo cellulare (Newcomer K et al., 2022). La maggior parte dei melanomi mostra l'iperespressione di MDM2/4 che è il principale regolatore negativo di p53. Infatti, fisiologicamente, MDM2/4 si lega a p53 e ne promuove la degradazione proteasomica ubiquitina-dipendente (Lee B et al., 2015). Nelle cellule tumorali, l'eccesso di MDM2/4 porta all'inattivazione di p53.

Per ciò che riguarda TP53, la maggior parte delle mutazioni sono missenso e determinano l'espressione di isoforme mutanti della proteina p53, che possono acquisire proprietà pro-oncogeniche (Yamamoto S et

al., 2018). Tra queste, la mutazione più comune è la E258K, caratterizzata dalla transizione C → T, tipica del danno indotto da raggi UV (Torrens-Mas M et al., 2020 - Hodis E et al., 2012). Questa mutazione colpisce p53 a livello del dominio legante il DNA impedendone il legame con le sequenze promotrici dei geni bersaglio responsabili dell'apoptosi.

La perdita di funzione di p53 può essere un evento relativamente tardivo nella progressione tumorale e contribuisce ulteriormente alla perdita del controllo proliferativo (Newcomer K et al., 2022).

Ciclina

La Ciclina D regola strettamente la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare (Newcomer K et al., 2022). Alterazioni del numero di copie, come l'amplificazione di CCND1 (Ciclina D1), accelerano ulteriormente la divisione cellulare (Karimkhani C et al., 2017).

1.3.3. Mutazioni dei geni coinvolti nella pigmentazione

MC1R

Il gene MC1R codifica il recettore della melanocortina presente sui melanociti ed è responsabile della variabilità fenotipica della pigmentazione cutanea tra gli individui. Varianti di MC1R sono state associate al rischio di melanoma (Reddy BY et al., 2017).

Oltre ad avere un ruolo nella sintesi della melanina, l'attivazione di MC1R promuove l'integrità genomica del melanocita; pertanto, mutazioni non funzionali del recettore favoriscono l'oncogenesi indipendentemente dalla variabilità fenotipica della pigmentazione cutanea (Raimondi S et al., 2008). Le mutazioni più frequenti sono R151C, R160W, D294H e D84E e sono maggiormente associate a fenotipi con capelli rossi, pelle chiara e ad un significativo aumento del rischio di incidenza del melanoma (Tagliabue E et al., 2018).

MITF

È un fattore di trascrizione necessario per lo sviluppo dei melanociti che può fungere da "oncogene di sopravvivenza del lignaggio" nel melanoma, promuovendo la crescita attraverso l'espressione di proteine importanti per il differenziamento cellulare (Garraway LA et al., 2005). La dipendenza da meccanismi di sopravvivenza specifici del lignaggio è stata descritta nel melanoma e può conferire sensibilità a determinate terapie (Tsoi J et al., 2018).

Nel 2005, è stato dimostrato che una variante germinale MITF E318K è presente in circa l'1% degli individui di origine europea ed è associata a un rischio di melanoma da 3 a 5 volte superiore rispetto alla popolazione normale (Berwick M et al., 2014; Garraway LA et al., 2005; Yokoyama S et al., 2011).

MITF E318K è una variante con guadagno di funzione che causa una sumoilazione alterata della proteina e, di conseguenza, una regolazione alterata delle vie di trasduzione a valle di MITF (Yokoyama S et al., 2011).

1.3.4. Classificazione molecolare

In base alla mutazione principale "*driver*", il melanoma può essere classificato in quattro categorie molecolari (Cancer Genome Atlas Network, 2015):

- *Melanoma mutante BRAF*: caratterizzato dalla perdita di CDKN2A/p16 e dall'amplificazione di MITF e PD-L1; le mutazioni di TP53 risultano invece essere rare (Chin L et al., 2006);
- *Melanoma mutante RAS*: contraddistinto da una mutazione frequente di TP53 e dall'assenza di amplificazione di MITF o PD-L1 (Chin L et al., 2006);
- *Melanoma mutante NF1*: sottotipo di melanoma a perdita di funzione di un gene oncosoppressore; oltre a NF1, risultano essere frequentemente mutati anche i geni CDKN2A, RB1 e TP53 (Chin L et al., 2006);
- *Melanoma triplo wild-type*: privo di mutazioni in BRAF, NRAS e NF1; può presentare amplificazioni di MDM2 e CCND1, mentre TP53 è generalmente *wild-type* (Chin L et al., 2006).

Tutti e quattro i sottotipi sono accomunati dalla mutazione in IDH1 (isocitrato deidrogenasi 1) gene coinvolto nella regolazione epigenetica. Il gene PPP6C, che codifica per un inibitore di AURKA risulta essere mutato esclusivamente nelle classi BRAF- e RAS-mutanti. Il gene ARID2, coinvolto nel rimodellamento della cromatina, è *wild-type* nel sottotipo triplo *wild-type* mentre è mutato nelle altre sottoclassi (Tímár J et al., 2022).

1.3.5. Correlazione istologia-mutazioni

Esiste una stretta correlazione tra variante istologica e frequenza delle mutazioni degli oncogeni. Nei melanomi a diffusione superficiale (SSM) e nodulari (NM), l'ordine di frequenza delle mutazioni *driver* è $BRAF > NRAS > KIT$, mentre nelle forme acral-lentiginose, l'ordine risulta essere $KIT > BRAF > NRAS$.

Tra le principali varianti istologiche si annoverano:

- *Melanoma lentiginoso acrale (ALM)*: caratterizzato da instabilità cromosomica e da un carico mutazionale globale relativamente basso rispetto ad altri sottotipi cutanei (Tímár J et al., 2022);
- *Melanoma desmoplastico*: variante istologica rara, caratterizzata da un elevato carico mutazionale (TMB) e frequentemente associata a mutazioni del promotore di NFKBIE (Rabbie R et al., 2019). Inoltre, tale tipologia di melanoma può presentare mutazioni di

NF1 con una frequenza maggiore rispetto agli altri sottotipi di melanoma (Newcomer K et al., 2022);

- *Melanoma uveale*: si distingue nettamente dal melanoma cutaneo per la presenza di mutazioni nei geni GNAQ e GNA11, che codificano proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale a valle dei recettori accoppiati a proteine G, inclusi quelli correlati alla melanocortina-1 (Tímár J et al., 2016);
- *Melanoma ereditario*: caratterizzato dalla delezione di CDKN2A e a mutazioni germinali di CDK4 (chinasi ciclina-dipendente 4), MITF e BAP1 (*BRCA1 Associated Protein-1*; Law MH et al., 2012).

1.4. Diagnosi

La diagnosi di melanoma inizia con il sospetto clinico, solitamente posto in seguito alla osservazione di una lesione cutanea anomala rilevata dal paziente o identificata dal medico durante l'esame obiettivo (Newcomer K et al., 2022).

Sono stati sviluppati diversi metodi per identificare precocemente le lesioni pigmentate sospette, tra cui la regola dell'ABCDE (Asimmetria, Bordi irregolari, Colore disomogeneo, Diametro, Evoluzione; fig. 3). Le caratteristiche di ciascuna lesione devono essere interpretate nel contesto del profilo di rischio individuale, includendo fattori ambientali e genetici

(American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma, 2015).

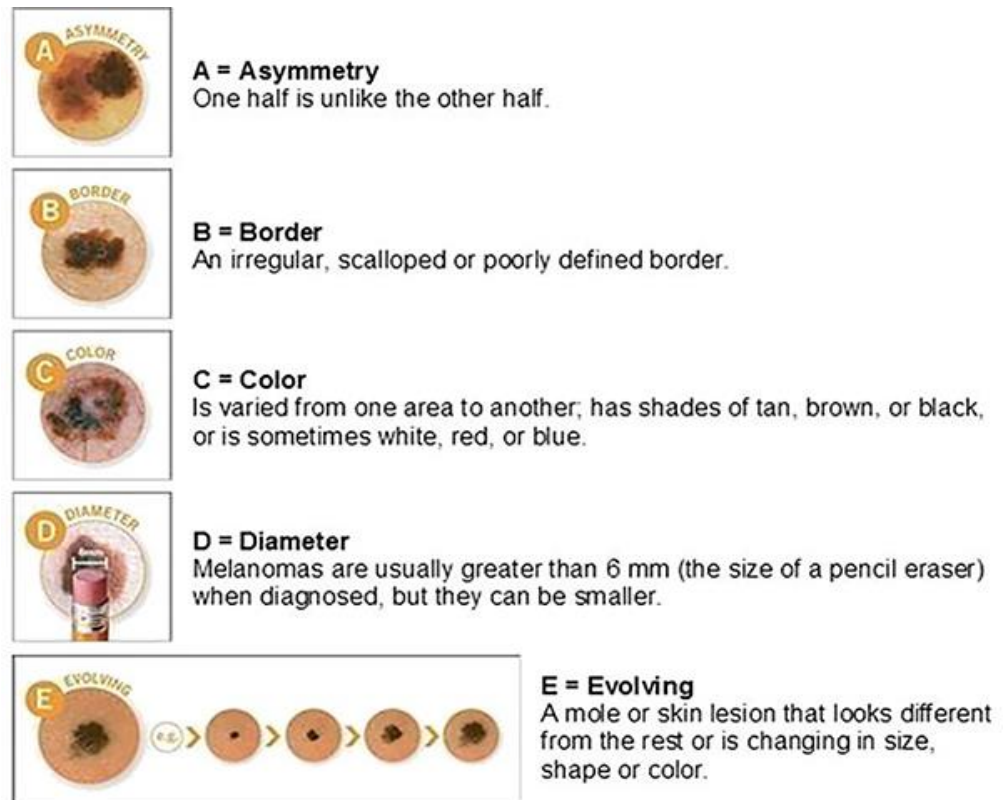


Figura 3. Criteri ABCDE dell'American Academy of Dermatology (Newcomer K et al., 2022).

I criteri clinici utilizzati per la diagnosi hanno il vantaggio di poter essere applicati non solo dai dermatologi, ma anche da altri medici e dalla popolazione in generale, contribuendo così alla diagnosi precoce della malattia (Carli P et al., 2004; Barnhill RL et al., 1992).

La valutazione iniziale del paziente con nuova diagnosi di melanoma primario comprende un'anamnesi accurata, un esame obiettivo completo e l'ispezione dell'intera superficie cutanea, con particolare attenzione ai

bacini linfonodali loco-regionali. Eventuali reperti anomali richiedono ulteriori accertamenti diagnostici mirati. Nei casi di melanoma di origine primaria sconosciuta, sono essenziali un esame anogenitale/pelvico e un esame oftalmologico dettagliato (Newcomer K et al., 2022).

La biopsia escissionale rappresenta il *gold standard* diagnostico per le lesioni pigmentate sospette, in quanto consente la valutazione completa dei principali parametri prognostici (Swetter SM et al., 2019).

Per la stadiazione istopatologica del melanoma, i parametri fondamentali sono lo spessore di Breslow e la presenza o assenza di ulcerazione (Eigentler TK et al., 2004). Ulteriori caratteristiche istologiche, quali lo stato dei margini di resezione, crescita verticale, microsatellitosi, invasione angiolinfatica, neurotropismo, regressione e presenza di linfociti infiltranti il tumore (TIL), possono fornire un valore prognostico aggiuntivo (Clemente CG et al., 1996; Straume O et al., 1996; fig. 4).

I progressi nella genetica molecolare del melanoma hanno portato allo sviluppo di test genetici e immunoistochimici utili per identificare i pazienti che potrebbero beneficiare di terapie mirate o immunoterapiche (Newcomer K et al., 2022). I principali target molecolari includono i geni *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e l'espressione di PD-L1 (Newcomer K et al., 2022; fig. 4).

La mutazione missenso del proto-oncogene *BRAF* al codone 600 (V600) è l'alterazione più frequente nel melanoma e conferisce sensibilità agli

inibitori di BRAF come vemurafenib e dabrafenib (Flaherty KT et al., 2010).

Le mutazioni di KIT, rilevabili mediante test molecolari, sono rare nel melanoma cutaneo, ma sono più frequenti nei melanomi mucosi e acrali lentiginosi, nei quali possono rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico (Carvajal RD et al., 2011).

Un'espressione di PD-L1 superiore all'1%, valutata mediante immunohistochimica, è stata correlata ad una maggiore probabilità di risposta ai trattamenti immunoterapici; tuttavia, la bassa specificità del biomarcatore ne riduce l'utilità clinica (Morrison C et al., 2018).

Dopo ampia escissione locale, è raccomandata la stadiazione istopatologica ed il sistema adottato è quello AJCC, 8ª edizione (2017), basato sulla classificazione TNM (Gershenwald JE et al., 2017).

La **categoria T** descrive le caratteristiche del tumore primitivo e comprende tumori con un bacino linfatico negativo e nessuna metastasi a distanza (*stadi da IA a IIC*; fig. 4), con stratificazione basata sullo spessore secondo Breslow e sulla presenza o assenza di ulcerazione. La presenza di metastasi linfonodali regionali colloca il paziente nello *stadio III* (IIIA-IIID; fig. 4) indipendentemente dalla categoria T.

Lo *stadio IV* è invece riservato alla malattia metastatica; le **sottocategorie M** comportano tutte la designazione di stadio IV, e sono suddivise in base alla sede anatomica della metastasi (Newcomer K et al., 2022; fig. 4).

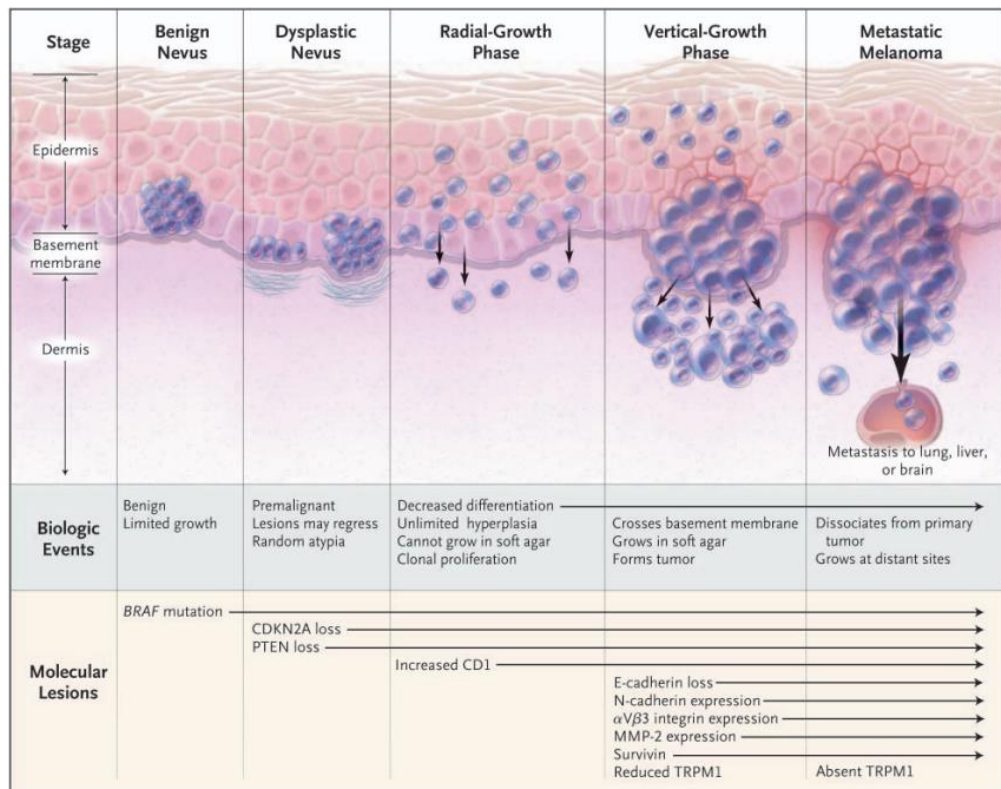


Figura 4. Cambiamenti molecolari nella progressione del melanoma.

Nello stadio di nevo benigno si verificano mutazioni di BRAF e la conseguente attivazione della via di segnalazione della MAPK. L'atipia citologica dei nevi displastici riflette lesioni nelle vie inibitorie associate a CDKN2A e PTEN. L'ulteriore progressione del melanoma è associata alla perdita di differenziamento cellulare ed alla ridotta espressione dei marcatori del melanoma regolati da MITF. La fase di crescita verticale ed il melanoma metastatico sono degni di nota per i notevoli cambiamenti nel controllo dell'adesione cellulare (Miller AJ et al., 2006).

1.5. Terapia

1.5.1. Terapia chirurgica e valutazione linfonodale

L'escissione chirurgica del tumore primario rappresenta lo standard di cura nel melanoma cutaneo localizzato. L'obiettivo dell'intervento è la rimozione completa della lesione con margini chirurgici adeguati, definiti in funzione dello spessore tumorale secondo

Breslow e della presenza di ulcerazione (Newcomer K et al., 2022). Nei pazienti con malattia ad alto rischio, la chirurgia è frequentemente seguita da terapia sistemica adiuvante, costituita da immunoterapia o da inibitori combinati di BRAF/MEK nei casi con mutazione BRAF (Newcomer K et al., 2022).

La chirurgia può anche avere un ruolo nella rimozione di lesioni metastatiche oligofocali refrattarie, quando vi è evidenza di risposta sistemica in altre parti del corpo.

In caso di malattia regionale "in transit" non resecabile o recidivante, viene applicato un approccio sistemico neoadiuvante (Newcomer K et al., 2022). Esistono dati che suggeriscono che la combinazione di terapia regionale seguita da immunoterapia con blocco dei *checkpoint* garantisca un migliore controllo locoregionale e sistemico della malattia rispetto alla sola chemioterapia regionale (Ariyan CE et al., 2018; Jiang BS et al., 2014).

Un elemento fondamentale nella gestione chirurgica del melanoma è rappresentato dalla valutazione linfonodale.

La dissezione elettiva dei linfonodi regionali (ELND), precedentemente utilizzata nei pazienti clinicamente N0, non ha dimostrato alcun beneficio in termini di sopravvivenza (Gonzalez A, 2018; Veronesi U et al., 1982). L'introduzione della biopsia del linfonodo sentinella (SLNB) nei melanomi in stadio I-II ha migliorato l'accuratezza della stadiazione (Newcomer K et al., 2022). Le linee guida internazionali ne

raccomandano l'utilizzo nei melanomi a spessore intermedio e nei melanomi spessi (Coit DG et al., 2019; Wong SL et al., 2018), mentre nei melanomi sottili (≤ 1 mm) il beneficio rimane controverso (Newcomer K et al., 2022).

In passato, la positività del linfonodo sentinella comportava la dissezione linfonodale completa (CLND) con l'obiettivo di migliorare il controllo locoregionale. Tuttavia, l'assenza di beneficio in guadagno della sopravvivenza e l'aumento significativo del rischio di linfedema hanno modificato l'approccio. Attualmente, nei pazienti a basso rischio con SLNB positiva, l'osservazione con ecografia linfonodale seriata rappresenta un'opzione sicura; mentre la CLND è invece indicata nei pazienti ad alto rischio (Newcomer K et al., 2022).

1.5.2. Terapia neoadiuvante

Nei pazienti con malattia resecabile, il trattamento standard prevede la resezione chirurgica seguita, se indicato, da terapia adiuvante con immunoterapia e/o inibitori delle chinasi nei pazienti BRAF-mutati (Coit DG et al., 2016).

Tuttavia, negli ultimi anni, sta emergendo il ruolo della terapia neoadiuvante con immunoterapia e/o terapie mirate. I vantaggi di questo approccio sono la riduzione del carico tumorale, la minore morbilità

chirurgica e la possibilità di valutare la risposta patologica alla terapia, correlata al rischio di recidiva.

L'immunoterapia neoadiuvante (pembrolizumab, nivolumab e ipilimumab, in monoterapia o in combinazione) ha dimostrato efficacia nel melanoma in stadio III (Blank CU et al., 2018; Najjar Y et al., 2019). Parallelamente, sono stati ottenuti risultati promettenti anche con la terapia mirata neoadiuvante (dabrafenib e trametinib) nei pazienti con melanoma BRAF-mutato (Newcomer K et al., 2022).

Attualmente, l'approccio neoadiuvante rappresenta una strategia terapeutica in evoluzione, con risultati promettenti soprattutto nei pazienti con malattia resecabile ad alto rischio (Newcomer K et al., 2022).

1.5.3. Terapia della malattia "in transit" non resecabile

La malattia "in transit", è caratterizzata dalla presenza di metastasi cutanee o sottocutanee che si sviluppano tra il sito primitivo e i linfonodi regionali; essa interessa il 3-10% dei casi di melanoma (Grünhagen DJ et al., 2006) e si manifesta prevalentemente a livello degli arti ma può coinvolgere anche tronco e distretto testa-collo (Gershenwald JE et al., 2017; Pawlik TM et al., 2005). Esistono diverse opzioni per il trattamento della malattia in transit, tra cui l'escissione chirurgica, i trattamenti loco-regionali invasivi e diverse terapie sistemiche. Molti orientamenti clinici suggeriscono di prendere in

considerazione la terapia non chirurgica in presenza di tre o più lesioni o qualora la resezione impedisca una chiusura cutanea diretta (Newcomer K et al., 2022).

Negli ultimi anni i trattamenti regionali sono stati ampiamente sostituiti da immunoterapia sistemica e terapie intralesionali (iniezione del trattamento direttamente nel melanoma), considerati oggi come prima linea di intervento. Le terapie intralesionali sono impiegate come complemento alla terapia sistemica ed hanno l'obiettivo di garantire il controllo locoregionale e di potenziare l'immunocitossicità sistemica. Sono terapie utilizzate per la malattia non localizzata ad un arto e per i pazienti che non sono idonei alla resezione chirurgica (Newcomer K et al., 2022).

La perfusione (ILP) e l'infusione (ILI) dell'arto, un tempo considerate terapie d'elezione, sono attualmente riservate alla terapia di salvataggio o ai pazienti senza altre opzioni terapeutiche. Tali metodiche permettono la somministrazione di alte dosi di agenti alchilanti, quali Melfalan, minimizzando l'esposizione sistemica (Newcomer K et al., 2022).

1.5.4. Terapia adiuvante

Dopo la resezione chirurgica, lo standard di cura per il melanoma in stadio IIIA o superiore prevede l'immunoterapia e terapie mirate nei casi BRAF-mutati (Newcomer K et al., 2022).

I. Immunoterapia

L'immunoterapia sistemica comprende l'utilizzo di citochine (IL-2 ed IFN- γ) che attivano una risposta immunitaria e di inibitori dei *checkpoint* immunitari (anti-CTLA-4 e anti-PD-1), anticorpi monoclonali che riducono la capacità delle cellule tumorali di eludere l'immunosorveglianza promuovendo l'attivazione delle cellule T (Sood S et al., 2021).

I.I. Citochine

L'attuale panorama terapeutico basato sulle citochine comprende i seguenti agenti:

- **Aldesleukin:** interleuchina-2 ricombinante ad alto dosaggio somministrata per attivare monociti e cellule T citotossiche; aumenta anche l'espressione dell'interferone-gamma (IFN γ) inducendo un'iperespressione delle molecole MHC sulle cellule APC, con conseguente maggiore capacità delle cellule T di riconoscere i tumori (Weiss GR et al., 2011). A causa del potenziale tossico non può essere considerata una terapia di prima linea per il melanoma metastatico che viene preferibilmente trattato con inibitori dei *checkpoint* e terapie mirate più tollerabili (Amaria RN et al., 2015);

- Interferone alfa-2b e interferone alfa-2b pegilato: attivano le cellule T CD4+ e CD8+ insieme alle Natural killer ed aumentano l'espressione delle molecole MHC di classe I favorendo la migrazione delle cellule T verso le cellule tumorali (Davar D et al., 2018). Anche in questo caso, il potenziale tossico non ne permette l'utilizzo come terapia di prima linea (Ascierto PA et al., 1999; Herndon TM et al., 2012);
- Vaccini e viroterapia oncolitica: forma precoce di immunoterapia contro il cancro (Ozao-Choy J et al., 2014). Si basa sulla risposta immunitaria adattativa: l'attivazione di cellule T CD8+, cellule T CD4+ o cellule B, impedisce alle cellule tumorali di sfuggire al riconoscimento immunitario (Ozao-Choy J et al., 2014);
- Talimogene laherparepvec (T-VEC): vaccino contenente il virus herpes simplex di tipo 1 modificato che agisce come virus oncolitico contro il melanoma (Harrington KJ et al., 2015). Può contribuire a esporre gli antigeni associati al tumore innescando così la risposta immunitaria antitumorale (Ribas A et al., 2017). In tale ambito, diversi studi condotti esaminando la combinazione di T-VEC con ipilimumab e pembrolizumab hanno mostrato tassi di risposta oggettiva (ORR) molto promettenti (Chesney J et al., 2018; Long GV et al., 2019).

I.II. Inibitori dei *checkpoint* immunitari

L'attuale approccio terapeutico prevede l'utilizzo di diversi anticorpi monoclonali diretti contro specifici bersagli molecolari, tra cui:

- **Ipilimumab:** anticorpo monoclonale anti-CTLA-4 che impedisce alle cellule tumorali di sfuggire alla risposta immunitaria (Hodi FS et al., 2010). È stato il primo ad essere approvato dalla FDA per l'uso nel melanoma in stadio III resecato (Newcomer K et al., 2022). Il suo impiego ha dimostrato un miglioramento significativo della sopravvivenza libera da recidiva (RFS) e della sopravvivenza globale (OS) a 5 anni rispetto al *placebo* (Eggermont AM et al., 2016);
- **Nivolumab e Pembrolizumab:** anticorpi anti-PD-1 approvati per l'uso in terapia adiuvante nel melanoma in stadio III e IV. Tali anticorpi si sono dimostrati superiori all'ipilimumab in termini di tassi di risposta e tossicità (Robert C et al., 2015);
- **Ipilimumab + Nivolumab:** combinazione approvata dallo studio CheckMate 067 per l'uso nella malattia non resecabile o metastatica (Newcomer K et al., 2022).

La terapia di combinazione con blocco dei *checkpoint* migliora la sopravvivenza determinando però un maggior numero di eventi avversi (Newcomer K et al., 2022).

II. Targeted therapies

L'inibizione combinata BRAF/MEK rappresenta il *gold standard* nei pazienti con mutazione BRAF V600 (Inamdar GS et al., 2010; fig. 5).

II.I. Inibitori di BRAF

Il gene BRAF è il più comunemente mutato (42-66% dei casi), con una prevalenza della variante V600E, seguita dalla V600K (Davies H et al., 2002; Curtin JA et al., 2005; Rubinstein JC et al., 2010). I pazienti portatori di entrambe le mutazioni sono candidati al trattamento con terapia con inibitori di BRAF, i quali interrompono la segnalazione lungo la via MAPK bloccando la replicazione delle cellule maligne.

I principali farmaci inibitori di BRAF sono:

- Vemurafenib: primo farmaco della categoria, disponibile dal 2011; ha mostrato una riduzione relativa del 73% del rischio di progressione della malattia o di morte rispetto alla dacarbazina (Chapman PB et al., 2011);
- Dabrafenib: approvato come monoterapia per il melanoma metastatico con mutazione BRAF nel 2013 (Ballantyne AD et al., 2013) e recentemente approvato anche in combinazione con Trametinib nel 2018 (US Food and Drug Administration, 2018);

- Encorafenib: ha dimostrato avere maggiori effetti *on-target* ed un'emivita più lunga rispetto a dabrafenib e vemurafenib, il che ha contribuito alla sua maggiore efficacia (Sun J et al., 2018); ne è stata approvata la combinazione con binimetinib (Shirley M, 2018).

II.II. Inibitori di MEK

A completamento della terapia mirata contro la via di trasduzione del segnale, gli inibitori di MEK attualmente approvati per l'uso clinico sono:

- Trametinib: sebbene meno efficace in monoterapia rispetto agli inibitori di BRAF (Lugowska I et al., 2015), ha dimostrato un valore sinergico in combinazione con dabrafenib (US Food and Drug Administration, 2018);
- Cobimetinib: approvato nel 2015 per l'uso nel melanoma metastatico con mutazione BRAF in combinazione con vemurafenib (National Cancer Institute, 2015);
- Binimetinib: utilizzato nel melanoma metastatico con mutazione BRAF e NRAS; la FDA ha approvato la combinazione di encorafenib e binimetinib per il trattamento del melanoma metastatico con mutazione BRAF (Shirley M, 2018).

L'efficacia della monoterapia con inibitori di BRAF è spesso limitata nel tempo a causa dell'insorgenza di resistenze (Tanda ET et al., 2020). Inoltre, la monoterapia con inibitori di BRAF è stata associata alla comparsa di neoplasie cutanee secondarie (carcinomi squamocellulari e cheratoacantomi), che venivano prevenute con l'aggiunta di inibitori di MEK (McArthur GA et al., 2014).

La combinazione di inibitori di BRAF con inibitori di MEK è in grado di potenziare l'inibizione della MAPK ritardando le resistenze e riducendo l'incidenza di tossicità cutanee secondarie.

Attualmente, le tre combinazioni approvate per il trattamento adiuvante (vemurafenib/cobimetinib, dabrafenib/trametinib ed encorafenib/binimetinib) rappresentano lo standard terapeutico.

Lo studio *COMBI-AD* ha evidenziato una sopravvivenza libera da recidiva a 3 anni del 58% nei pazienti trattati con dabrafenib più trametinib (rispetto al 39% del placebo) (Long GV et al., 2017); i benefici sono mantenuti indipendentemente dallo stadio, infiltrazione linfonodale e ulcerazione tumorale (Hauschild A et al., 2018).

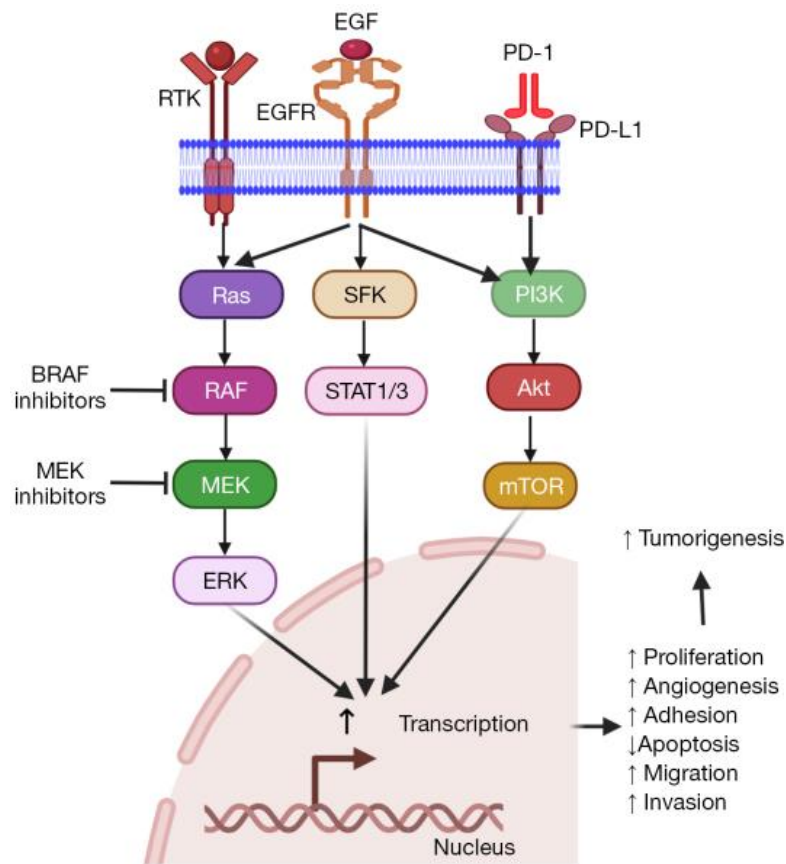


Figura 5. Vie molecolari coinvolte nello sviluppo del melanoma e ruolo degli inibitori di BRAF e MEK (Nigam S et al., 2025).

1.5.5. Radioterapia

Per i pazienti ad alto rischio di recidiva locoregionale, può essere impiegata la radioterapia, ma non è stato dimostrato che abbia un effetto sulla sopravvivenza complessiva a lungo termine (Burmeister BH et al., 2012). Inoltre, la radioterapia è utile per quei pazienti che non sono buoni candidati chirurgici e nei quali il trattamento è finalizzato al sollievo dei sintomi (Shitara D et al., 2015).

1.5.6. Chemioterapia tradizionale

Nonostante l'avvento dell'immunoterapia e delle terapie mirate, la chemioterapia rimane una importante risorsa nel tentativo di eradicare il melanoma, ma il suo successo a lungo termine è limitato da un'alta incidenza di recidive dovute alla resistenza acquisita (Sood S et al., 2021).

I. Agenti Alchilanti

Sono la classe di chemioterapici più comunemente impiegata nel trattamento del melanoma (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2024; Wichtowski M et al., 2018). I principali agenti alchilanti sono:

- Dacarbazina (DTIC): approvata negli anni '70, agisce come agente alchilante del DNA metilando le basi puriniche. Studi clinici di fase III hanno mostrato un successo limitato con tassi di risposta dal 10% al 20% (Jiang G et al., 2014). Inoltre, a causa della sua citotossicità aspecifica, è stata associata a significativi effetti collaterali come la soppressione dell'emopoiesi e la conseguente anemia (Jiang G et al., 2014);
- Temozolomide: agente alchilante analogo della Dacarbazina, possiede il vantaggio di attraversare la barriera emato-encefalica, risultando utile nel trattamento delle metastasi cerebrali (Sood S et al., 2021);

- Fotemustina: agente alchilante appartenente al gruppo delle nitrosouree, agisce aggiungendo gruppi cloroetilici alle basi guaniniche (Guida M et al., 2018).

II. Agenti che interferiscono con i microtubuli

I principali composti utilizzati in questo ambito sono:

- Paclitaxel: chemioterapico comunemente utilizzato. Promuove la polimerizzazione della tubulina portando all'inibizione del ciclo cellulare nella fase G2/M e quindi all'innescamento dell'apoptosi (Legha SS et al., 1990);
- Vinblastina e vincristina: alcaloidi della vinca, inducono l'apoptosi inibendo la polimerizzazione della tubulina (Florian S et al., 2016).

III. Composti del Platino

Tra gli analoghi del platino più impiegati si trovano cisplatino e carboplatino; ampiamente utilizzati nel trattamento dei tumori metastatici sono agenti alchilanti del DNA che si legano ai residui purinici (Johnstone TC et al., 2014).

IV. Antracicline

L'agente chemioterapico appartenente a questa categoria più utilizzato nel trattamento del melanoma è la doxorubicina che agisce bloccando l'enzima topoisomerasi II utilizzato nella replicazione del DNA, portando all'attivazione dell'apoptosi (Sood S et al., 2021) e alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Thorn CF et al., 2011).

1.5.7. Terapia della malattia metastatica (stadio IV)

Il melanoma cutaneo è considerato metastatico quando si diffonde oltre i linfonodi regionali (American Joint Committee on Cancer, 2009).

Un fattore prognostico significativo nei pazienti con malattia metastatica è il livello di lattato deidrogenasi (LDH) (Bedikian AY et al., 2008). I livelli di LDH sono integrati nel sistema di stadiazione AJCC per classificare la malattia metastatica a distanza (Gershenwald JE et al., 2017). I tassi di sopravvivenza globale a 1 e 2 anni nei pazienti con livelli di LDH normali sono il doppio di quelli dei pazienti con LDH elevata (Balch CM et al., 2009).

Al termine di una valutazione approfondita, che comprende anche test genetici per individuare possibili mutazioni (BRAF V600E, V600K, KIT), il paziente con melanoma metastatico può iniziare diversi percorsi terapeutici a seconda dell'entità e della localizzazione delle metastasi

(Newcomer K et al., 2022). I pazienti con malattia non suscettibile di resezione chirurgica dovrebbero iniziare una terapia sistemica.

L'ultimo decennio ha segnato una rivoluzione nel trattamento del melanoma in stadio IV: prima del 2011 tali pazienti erano trattati con Dacarbazina, dopo il 2011, nel trattamento dello stadio IV è subentrata l'immunoterapia combinata e la *targeted therapy* (Newcomer K et al., 2022).

Per quanto concerne l'immunoterapia combinata, viene utilizzata l'associazione nivolumab + ipilimumab, che garantisce il blocco simultaneo di PD-1 e CTLA-4. Tale associazione ha portato la sopravvivenza a 5 anni oltre il 50%, sebbene con un tasso di eventi avversi di grado III-IV vicino al 60% (Larkin J et al., 2015; Larkin J et al., 2019).

Una caratteristica unica del profilo farmacodinamico di ipilimumab è una risposta tumorale relativamente ritardata. Inoltre, la massa tumorale potrebbe inizialmente progredire, a causa di un arrivo di cellule infiammatorie reclutate nell'area, per poi ridursi successivamente. Questo fenomeno farmacodinamico caratteristico è la pseudoprogressione (Kirkwood JM et al., 2008).

Nei pazienti con mutazione *BRAF V600*, viene utilizzata la *targeted therapy* combinata (es. dabrafenib/trametinib) (Robert C et al., 2019; Newcomer K et al., 2022). Tuttavia, lo sviluppo di resistenza, osservato

in circa la metà dei pazienti dopo meno di un anno di terapia, rimane però una sfida importante (Tanda ET et al., 2020). In sintesi, nonostante il calo della mortalità registrato dal 2011 (Berk-Krauss J et al., 2020), la gestione della malattia metastatica sintomatica e la gestione delle resistenze farmacologiche richiedono la ricerca di nuove strategie metaboliche e immunomodulatorie.

1.6. Chemioresistenza

Nonostante la presenza di vari farmaci per il trattamento dei melanomi, la resistenza alle terapie rappresenta una sfida clinica importante. Le cellule del melanoma possono infatti sviluppare meccanismi per eludere la terapia e questo spesso si verifica a causa di mutazioni che attivano vie di segnalazione alternative (Nigam S et al., 2025).

La chemioresistenza può essere sia intrinseca (primaria), se costitutivamente presente nel tumore, o estrinseca (secondaria), se insorge a seguito del trattamento farmacologico.

Circa il 15-20% dei ceppi di melanoma manifesta una forma di resistenza primaria alle terapie utilizzate; la resistenza secondaria però nel tempo risulta statisticamente più frequente rispetto a quella intrinseca (Czarnecka AM et al., 2020).

La resistenza tumorale si osserva in particolare con gli inibitori di BRAF (BRAFi) e gli inibitori dei checkpoint immunitari (Sood S et al., 2021; Keller HR et al., 2017). Pertanto, comprendere i meccanismi molecolari alla base della chemioresistenza è fondamentale per sviluppare nuove strategie terapeutiche in grado di contrastarla (Nigam S et al., 2025).

1.6.1. Resistenza intrinseca

Il 5% dei melanomi che sviluppano resistenza intrinseca presenta mutazioni attivanti di MEK che li rende resistenti a inibitori di MEK e BRAF (Tangella LP et al., 2021). Ciò consente alla via MAPK/MEK di essere costitutivamente attivata anche in presenza di questi farmaci.

Un altro meccanismo è rappresentato dall'iperespressione o amplificazione della ciclina D1, codificata dal gene CCND1 (Dulgar O et al., 2021), riscontrata nell'11% dei melanomi (Tangella LP et al., 2021). Inoltre è stato osservato che l'aumento della ciclina D1 aumenta la resistenza agli inibitori di BRAF, in particolare al dabrafenib (Tangella LP et al., 2021).

1.6.2. Resistenza estrinseca

Questo tipo di resistenza è causata da meccanismi adattativi che coinvolgono sia le cellule tumorali sia il microambiente (Nigam S et al., 2025).

Un fattore di rilevante importanza in questo ambito è l'HGF (*hepatocyte growth factor*) proveniente dal microambiente tumorale. L'HGF attivato lega il recettore MET, promuovendo migrazione e proliferazione e consentendo la riattivazione della via MAPK nonostante l'inibizione farmacologica, contribuendo così alla resistenza agli inibitori di MEK (Tangella LP et al., 2021).

Un'altra modalità di resistenza estrinseca è la perdita di SOX10, fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo dei melanociti, nella proliferazione cellulare e nella funzione mitocondriale (Capparelli C et al., 2022). La sua riduzione è associata alla resistenza al vemurafenib attraverso l'attivazione della via mediata da TGF- β e la successiva iperregolazione di EGFR e PDGFR β (Guo W et al., 2021). Tuttavia, altri studi hanno dimostrato che una diminuzione di SOX10 può aumentare la sensibilità agli inibitori delle MAPK in melanomi BRAF-mutati (Guo W et al., 2021). L'effetto controverso di SOX10 dimostra che i meccanismi della resistenza correlati a questo fattore di trascrizione non sono stati ancora completamente identificati (Nigam S et al., 2025).

Esistono quattro varianti di splicing di BRAF V600E (p41, p48, p55 e p61) (Clark ME et al., 2020) presenti nel 13-30% dei melanomi (Tangella LP et al. 2021). La presenza di queste isoforme può conferire resistenza specifica agli inibitori di BRAF, anche se assunti in combinazione con inibitori di MEK.

Le varianti menzionate sono caratterizzate dalla perdita del dominio di legame per Ras, alterazione strutturale che ne permette la dimerizzazione costitutiva eludendo l'inibizione farmacologica (Nigam S et al., 2025).

Oltre ai meccanismi MAPK-dipendenti, esistono anche modalità di resistenza MAPK-indipendenti che coinvolgono la via fosfoinositide 3-chinasi (PI3K)/proteina chinasi B (AKT). L'attivazione compensatoria di AKT consente il mantenimento dei segnali proliferativi e di sopravvivenza, aggirando il blocco farmacologico di BRAF e MEK (Zhong J et al., 2022).

1.6.3. Meccanismi di chemioresistenza

I. Evasione dall'apoptosi

La riduzione della suscettibilità all'apoptosi contribuisce in modo significativo alla tumorigenesi ed alla progressione del melanoma (Nigam S et al., 2025). Le cellule di melanoma presentano resistenza intrinseca all'apoptosi, dovuta all'alterazione delle vie apoptotiche e garantita dalla riprogrammazione delle vie di proliferazione e sopravvivenza cellulare (Soengas MS et al., 2003; fig. 6).

I meccanismi alla base di questa alterazione sono dovuti a: i) attivazione di fattori antiapoptotici ed inattivazione di effettori proapoptotici; ii) rafforzamento dei segnali di sopravvivenza che coinvolgono un'alterata

espressione di proteine inibitrici dell'apoptosi; iii) inattivazione del *pathway* p53 dipendente; iv) resistenza ai ligandi di morte; v) attivazione delle vie di sopravvivenza come PI3K/AKT/ PTEN e delle vie NF-κB e Raf/MAPK che regolano l'espressione di geni pro-apoptotici e anti-apoptotici (Soengas MS et al., 2003; Eberle J et al., 2007).

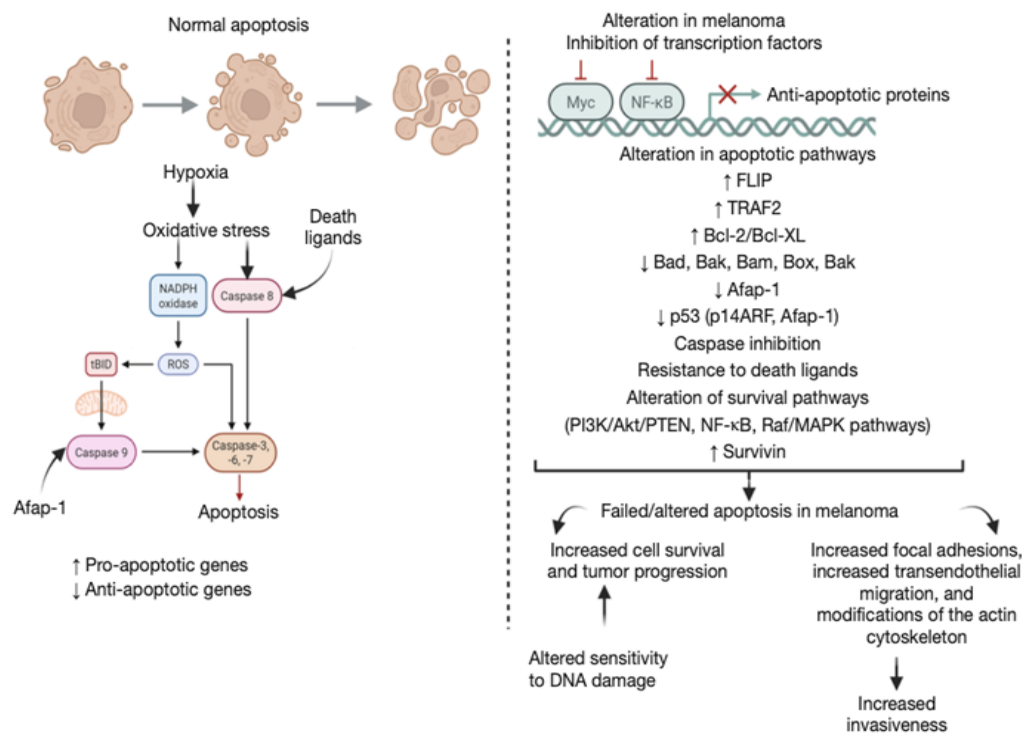


Figura 6. Resistenza delle cellule di melanoma all'apoptosi.

A sinistra è riportato uno schema della sequenza di eventi che portano alla morte apoptotica. A destra sono invece riportati i principali meccanismi che contribuiscono a rendere il melanoma resistente agli stimoli apoptotici (Nigam S et al., 2025).

II. Alterazioni delle vie di trasduzione del segnale

Mutazioni, principalmente attivanti, a carico di MEK, RAF o di altre componenti delle vie di trasduzione del segnale possono riattivare

la via MAPK (Nigam S et al., 2025) nonostante il blocco farmacologico garantito dagli inibitori di BRAF e MEK (Al Hmada Y et al., 2024; Kozar I et al., 2019; fig. 7). Oltre alla segnalazione delle MAPK, nei melanomi chemioresistenti è comunemente osservata l'iperattivazione della via PI3K-mTOR. Tale fenomeno può essere conseguente ad una mutazione o alla delezione del gene PTEN (inibitore della via PI3K-mTOR) riscontrata in circa il 10% dei melanomi, con conseguente perdita del controllo negativo sulla via PI3K/AKT/mTOR (Zuo Q et al., 2018; fig. 7).

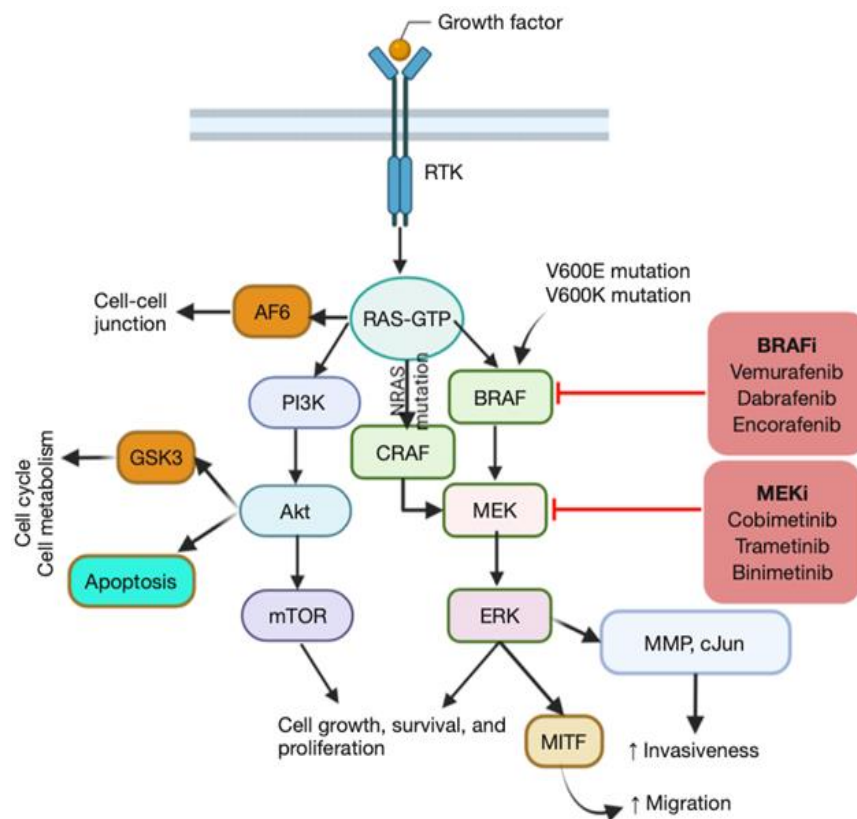


Figura 7. Alterazioni dei principali pathway di segnalazione e relativi bersagli molecolari coinvolti nel trattamento del melanoma con mutazione BRAF^{V600E} e BRAF^{V600K} (Nigam S et al., 2025).

III. Epigenetica

Le alterazioni epigenetiche rappresentano un importante meccanismo di chemioresistenza nel melanoma (fig. 8). In particolare, la metilazione aberrante del DNA a carico dei geni oncosoppressori è un importante meccanismo di inattivazione funzionale frequentemente riscontrato nelle cellule chemioresistenti (Nigam S et al., 2025). Queste alterazioni sono spesso sostenute dall'iperattivazione di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella proliferazione, in particolare PI3K/AKT e MAPK (Giunta EF et al., 2021; Lee JJ et al., 2014).

Oltre alla metilazione del DNA, anche modificazioni post-traduzionali degli istoni (metilazione, deacetilazione e demetilazione) contribuiscono alla resistenza agli inibitori della via MAPK-dipendente (Rubanov A et al., 2022). Poiché queste alterazioni epigenetiche sono reversibili, possono rappresentare bersagli promettenti per superare la chemioresistenza.

Inibitori della DNA-metiltransferasi (DNMTi) e dell'istone-deacetilasi (HDACi) possono ripristinare la sensibilità apoptotica e migliorare la risposta ai trattamenti. Inoltre, gli oligonucleotidi antisenso possono essere utilizzati per modulare l'espressione di regolatori epigenetici specifici (Strub T et al., 2020; Wang N et al., 2023).

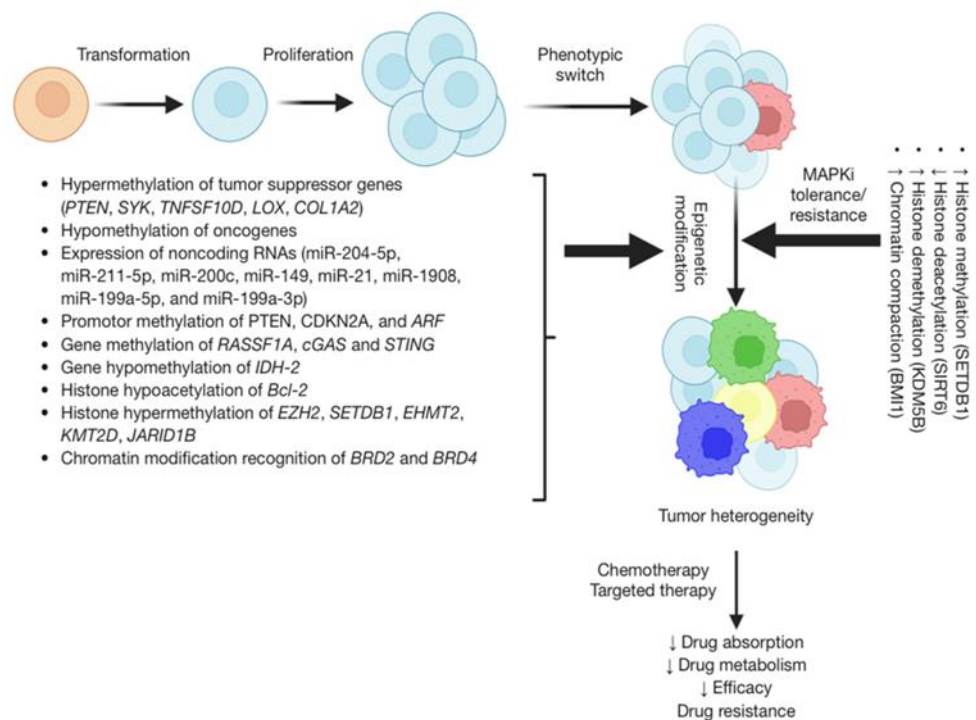


Figura 8. Modificazioni epigenetiche e *switching* fenotipico che contribuiscono alla chemioresistenza nel melanoma (Nigam S et al., 2025).

IV. *Switching* fenotipico

Il melanoma è un tumore eterogeneo, caratterizzato da una popolazione cellulare capace di transizioni dinamiche tra diversi stati trascrizionale e fenotipici (Nigam S et al., 2025). Lo *switching* fenotipico comporta passaggio tra stati quiescenti e proliferativi del ciclo cellulare, modifiche nell'invasività, rimodulazione delle vie di segnalazione ed alterazioni dell'espressione genica. Tale plasticità contribuisce alla chemioresistenza e rappresenta uno dei principali determinanti dell'aggressività del melanoma e della sua capacità di metastatizzare ai

linfonodi e agli organi secondari (Hossain SM et al., 2023; Bailey CM et al., 2012).

Il mediatore molecolare più studiato in questo contesto è il fattore di trascrizione MITF, che è stato citato precedentemente. Infatti, è stato osservato che melanomi non invasivi presentano livelli elevati di MITF, associati ad un fenotipo differenziato; al contrario i melanomi invasivi presentano bassi livelli MITF (Hoek KS et al., 2008).

Questa plasticità fenotipica delle cellule del melanoma contribuisce alla resistenza crociata sia alla terapia mirata sia alla terapia con inibitori dei checkpoint immunitari (Diazzi S et al., 2023).

V. Alterazione metabolica

Le cellule di melanoma mostrano una grande flessibilità metabolica grazie alla quale riescono ad adattarsi a microambienti tumorali ipossici o poveri di nutrienti. Questo adattamento si realizza attraverso l'aumento della sintesi lipidica e l'utilizzo dei lipidi come fonte di energia alternativa (Nigam S et al., 2025). Inoltre, un fattore associato alla maggiore invasività tumorale è l'elevata sintesi di acidi grassi, in particolare sfingolipidi, glicerofosfolipidi, steroli ed eicosanoidi (Pellerin L et al., 2020).

La riprogrammazione metabolica, con passaggio da glicolisi a metabolismo lipidico contribuisce alla resistenza alle terapie mirate. Tale

evento è dovuto al fatto che i lipidi regolano processi cellulari fondamentali per la sopravvivenza cellulare quali la funzione della glicoproteina P di membrana, il traffico di membrana, le vie apoptotiche, il trasporto dei farmaci e l'endocitosi (Nigam S et al., 2025).

VI. Microambiente tumorale

Il microambiente tumorale (TME) è un sistema complesso costituito oltre che dalle cellule tumorali anche da cellule stromali, cellule immunitarie e matrice extracellulare (Nigam S et al., 2025).

Le cellule stromali svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del cancro. In particolare i fibroblasti associati al cancro (CAF) costituiscono la maggior parte dello stroma tumorale e promuovono l'iniziazione del cancro, l'angiogenesi, l'invasione e la metastasi (Mao Y et al., 2013). I CAF contribuiscono alla chemioresistenza attraverso diversi meccanismi, tra cui l'espressione di vari sottotipi di CAF, la secrezione di citochine ed il rilascio di esosomi (Nigam S et al., 2025).

Le cellule stromali possono secernere fattori di crescita che determinano l'attivazione delle vie di MAPK e PI3K-AKT, conferendo resistenza agli inibitori di BRAF (Straussman R et al., 2012).

Infine, il TME può promuovere la proliferazione delle cellule di melanoma attraverso una maggiore produzione di proteine della matrice

extracellulare come il collagene che, fornendo un ambiente più rigido, garantisce la proliferazione tumorale (Kozar I et al., 2019).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Il melanoma metastatico è uno dei tumori più letali a causa dell'inefficacia delle terapie attuali. Negli ultimi 15 anni sono state sviluppate terapie mirate contro BRAF e MEK (Jaune E et al., 2018). Sebbene i risultati iniziali sembrassero promettenti, con un aumento della sopravvivenza globale ed una riduzione delle dimensioni del tumore primario, la maggior parte dei pazienti sviluppava resistenza entro pochi mesi, con conseguente progressione metastatica e la formazione di recidive (Aplin AE et al., 2011; Flaherty KT et al., 2012). L'identificazione di nuovi composti antineoplastici in grado di superare tali meccanismi di adattamento rappresenta quindi una priorità clinica e scientifica.

In tale contesto, studi precedentemente condotti presso il laboratorio dove ho svolto la tesi, hanno dimostrato che l'acquisizione della resistenza al vemurafenib è associata al mantenimento di un efficace metabolismo ossidativo nelle cellule di melanoma (Garbarino O et al., 2023). Tale evidenza suggerisce che la riprogrammazione metabolica rappresenti un elemento chiave nella sopravvivenza delle cellule resistenti e possa costituire un potenziale bersaglio terapeutico. In tale contesto, si è ipotizzato che la metformina possa rappresentare una strategia terapeutica ottimale per colpire le cellule di melanoma

resistenti, grazie alla sua capacità di modulare il metabolismo energetico ed agire come inibitore della respirazione mitocondriale. La metformina è la biguanide più comunemente utilizzata nel trattamento del diabete di tipo II ed esercita la sua azione: i) aumentando l'assorbimento del glucosio attraverso la traslocazione sulla membrana plasmatica del trasportatore del glucosio 1 (GLUT-1), sia nelle cellule epatiche (Gunton JE et al., 2003) che nelle cellule muscolari scheletriche (Fischer Y et al., 1995); ii) incrementando l'espressione dei substrati del recettore dell'insulina 1 e 2 (IRS-1 e 2), con conseguente miglioramento dell'assorbimento del glucosio (Jaune E et al., 2018); iii) inibendo la gluconeogenesi epatica attraverso il blocco degli effetti del glucagone (Fulgencio JP et al., 2001).

I pazienti diabetici presentano un rischio maggiore di sviluppare tumori rispetto ai pazienti sani a causa dell'aumento dei livelli di fattori di crescita circolanti, come l'insulina o i fattori di crescita insulinici 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) (Giovannucci E et al., 2010). In questo contesto, numerose analisi retrospettive hanno dimostrato un potenziale effetto antitumorale della metformina in pazienti con diabete di tipo II (Evans JM et al., 2005; Monami M et al., 2009).

Attualmente, sono stati registrati 304 studi clinici sul trattamento con metformina in diversi tipi di cancro (Jaune E et al., 2018).

Uno dei principali effetti della metformina sulle cellule tumorali è l'inibizione indiretta del complesso mTORC1 (Jaune E et al., 2018), fondamentale regolatore della sintesi proteica e della crescita cellulare. Questo complesso è spesso attivato nelle cellule tumorali e può essere associato alla resistenza alla terapia antitumorale. Inoltre, mTORC1 svolge un ruolo fondamentale nella proliferazione e nella crescita delle cellule staminali normali e delle cellule staminali tumorali (Jaune E et al., 2018).

L'inibizione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale causata dalla metformina interrompe la produzione di ATP nella cellula (Miller RA et al., 2010) e induce l'attivazione dell'AMPK (Zhou G et al., 2001). L'attivazione dell'AMPK agisce come regolatore oncosoppressivo regolando processi come la crescita e la proliferazione cellulare, il controllo del ciclo cellulare, la polarità cellulare, l'apoptosi e l'autofagia (Luo Z et al., 2010).

Inoltre, l'AMPK può fosforilare direttamente p53 sulla serina 15, aumentando l'espressione di p21 e promuovendo l'arresto del ciclo cellulare (Jones RG et al., 2005). La comprensione dei meccanismi molecolari con cui la metformina interferisce con le riserve energetiche delle cellule di melanoma resistenti è fondamentale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Alla luce di queste evidenze, scopo del lavoro di tale tesi è stato quello di valutare se la modulazione metabolica

indotta dalla metformina potesse compromettere la sopravvivenza e il potenziale clonogenico delle cellule resistenti, fornendo un razionale sperimentale per future strategie terapeutiche combinatorie.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Sostanze chimiche

Il vemurafenib (PLX4032) e la metformina sono stati acquistati da Selleck Chemicals LLC (Houston, TX, USA). Le polveri di tali composti sono state dissolte in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2. Linee cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su una linea cellulare di melanoma metastatico MeOV (BRAF^{V600E}), derivata da una biopsia di paziente (Furfaro A et al., 2022) e resa resistente al PLX (MeOV-PLX-R) presso il laboratorio in cui è stata svolta questa tesi (Garbarino O et al., 2023).

Le cellule sono state mantenute in terreno RPMI 1640 (Euroclone Spa, Pavia, Italia) integrato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Euroclone Spa, Pavia, Italia), l'1% di L-glutammina (Euroclone Spa, Pavia, Italia) e l'1% di penicillina/streptomina (Euroclone Spa, Pavia, Italia) in condizioni standard di crescita (37 °C e 5% di CO₂).

3.3. Trattamenti

Le cellule MeOV-PLX-R sono state trattate per 24, 48, 72, 96 e 120 ore con PLX4032 1.5 μ M, e con metformina 10 mM somministrate in singolo o in combinazione.

Le colture cellulari sono state attentamente monitorate prima e durante gli esperimenti per garantire una densità cellulare ottimale. In particolare, i trattamenti non venivano effettuati ad una confluenza della coltura cellulare > 90%.

3.4. Saggio di vitalità (MTS)

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio colorimetrico di proliferazione cellulare che utilizza come reagente il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA), seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. L'MTS è in grado di misurare la proliferazione cellulare tramite l'attività delle deidrogenasi mitocondriali. Le cellule (10^4 cellule/pozzetto) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) e lasciate aderire per una notte. Il giorno successivo, sono state trattate con i farmaci oggetto di studio sopra menzionati, somministrati da soli o in combinazione. Successivamente, le cellule sono state incubate

per un'ora con 20 μ L di CellTiter in condizioni standard (37 °C e 5% di CO₂).

Il saggio si basa sulla variazione di colore dovuto alla riduzione del sale di tetrazolio (giallo) in formazano (viola scuro) che avviene ad opera delle deidrogenasi mitocondriali, attive solo nelle cellule metabolicamente attive e vitali. La quantità di formazano intracellulare formatasi viene misurata spettrofotometricamente attraverso un lettore di micropiastre (EL-808, BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT, USA) ad una lunghezza d'onda di 490 nm.

3.5. Clonogenicità

Per valutare il potenziale clonogenico delle cellule è stato eseguito il saggio *in vitro* di crescita ancoraggio-dipendente (Franken N et al., 2006). Le cellule MeOV-PLX-R (150 per pozzetto) sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (Corning) e trattate con PLX4032 e metformina da soli o in combinazione. Successivamente, il terreno è stato cambiato e le cellule sono state mantenute in terreno privo di farmaci per 20 giorni. Infine, le colonie cellulari sono state fissate con metanolo e colorate con una soluzione di cristalvioletto (0,5% (p/v) in acqua con metanolo al 50% (v/v)). Infine, le colonie composte da 30 o più cellule sono state osservate e contate al microscopio ottico.

3.6. Perossidazione lipidica (LPO)

Il rilevamento della perossidazione lipidica è stato effettuato utilizzando il kit Image-iTM Lipid Peroxidation (Thermo Fisher), che si basa sulla ossidazione del reagente BODIPYTM 581/591 C11. Questa sonda è un analogo fluorescente lipofilo degli acidi grassi che viene incorporato nella membrana cellulare e passa dall'emissione fluorescente rossa a quella verde in seguito all'ossidazione avviata da radicali ossi-, idrossi- o perossi-, ma non da superossido, ossido di metilene o idroperossidi (Pap EH et al., 2000; Drummen GP et al., 2002; Lafin JT et al., 2019; Martinez AM et al., 2020).

Le cellule (10^4 cellule/pozzetto) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate con i farmaci oggetto di studio, da soli o in combinazione. Successivamente, è stato aggiunto il reagente BODIPY e le cellule sono quindi state incubate per 30 minuti a 37°C. Il reagente è stato quindi rimosso e le cellule sono state lavate con PBS. La fluorescenza è stata monitorata con il fluorimetro Perkin Elmer (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, USA) prima a 580/590 nm di eccitazione/emissione e poi a 485/520 nm, ed il rapporto è stato utilizzato per l'analisi dei dati.

3.7. Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm SEM calcolata su almeno quattro esperimenti indipendenti. La significatività statistica delle differenze tra le varie misure nei gruppi sperimentali è stata valutata mediante ANOVA ad una via, seguita dal test di Dunnet, utilizzato per effettuare un confronto multiplo tra i risultati. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4. RISULTATI

4.1. Il trattamento combinato con PLX4032 e metformina riduce marcatamente la vitalità delle cellule PLX- resistenti

Le cellule sono state trattate per 24, 48, 72, 96 e 120 ore con PLX4032 1.5 μ M e con metformina 10 mM da soli o in combinazione.

Come si può osservare nel grafico riportato in figura 9, il trattamento per 24h con PLX4032 aumentava la vitalità del 13% delle cellule MeOV-PLX-R, mentre la metformina, somministrata da sola, non induceva variazioni significative sulla vitalità cellulare. Al contrario, il trattamento combinato (PLX4032 + metformina) a 24h diminuiva la vitalità cellulare del 18% rispetto alle cellule trattate con il solo PLX.

Dopo 48 ore di trattamento, la vitalità cellulare risultava ridotta del 18% in tutte le condizioni di trattamento.

A partire dalle 72 ore, in tutte le condizioni, si assisteva ad una riduzione tempo-dipendente della vitalità cellulare. In particolare, a 72 ore si osservava una riduzione della vitalità pari al 23% nelle cellule trattate con metformina, del 31% in quelle esposte al PLX e del 36% in seguito al trattamento combinato (fig. 9). Il trattamento di 96 ore induceva una riduzione della vitalità pari al 33% e al 46% delle cellule trattate rispettivamente con metformina o PLX4032, mentre il trattamento combinato agiva in sinergia e riduceva la vitalità del 60% rispetto alle

cellule non trattate e del 30% rispetto a quelle esposte al PLX. Infine, una ulteriore riduzione della vitalità era osservata a 120 ore, tempo in cui la metformina ed il PLX4032 erano in grado di ridurre la vitalità rispettivamente del 49% e del 70% (fig. 9).

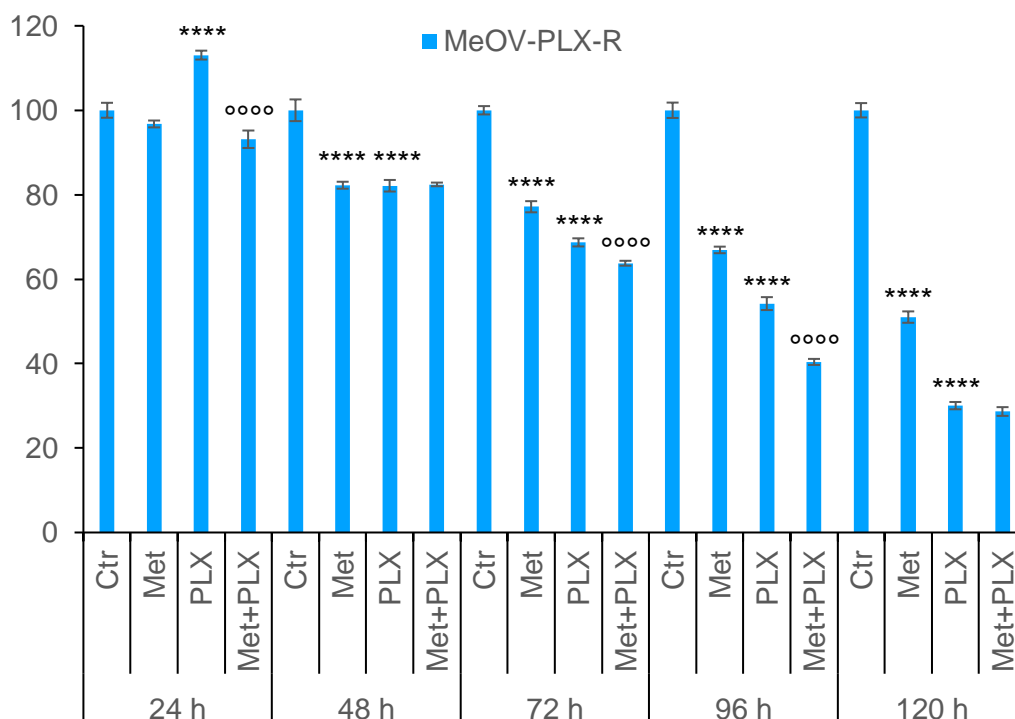


Figura 9. Il trattamento combinato con PLX4032 e metformina riduce marcatamente la vitalità delle cellule PLX-resistenti.

Il grafico mostra la vitalità delle linee cellulari MeOV-PLX-R trattate con PLX4032 1.5 μ M e metformina 10 mM da soli o in combinazione per 24, 48, 72, 96 e 120 ore. La vitalità cellulare è stata analizzata mediante saggio con MTS. I risultati sono stati riportati come variazione percentuale della vitalità cellulare ottenuta nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate (Ctr, 100%). L'istogramma riportato riassume i dati quantitativi delle medie \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti. **** p <0.0001 vs. Ctr; oooo p <0.0001 vs. PLX

4.2. Il trattamento combinato potenzia l'effetto lipoperossidativo del PLX4032 e della metformina.

Le cellule sono state trattate per 72, 96 e 120 ore con PLX4032 1.5 μ M e con metformina 10 mM da soli o in combinazione. Come si può osservare nel grafico riportato in figura 10, il trattamento per 72 ore con PLX4032 in combinazione con metformina induceva un incremento del 31% della lipoperossidazione di membrana rispetto a quella rilevata nelle cellule non trattate (Ctr) o in quelle esposte al PLX o alla metformina in singola somministrazione. Invece, a 96 ore, il trattamento con metformina e PLX aumentavano l'effetto lipoperossidativo del 49% e del 32% rispettivamente, paragonandolo a quello delle cellule non trattate (Ctr). A tale tempistica, il trattamento combinato induceva un incremento della perossidazione lipidica pari al 46% (fig. 10).

A 120 ore, il trattamento con metformina e PLX4032 somministrati da soli e in combinazione, aumentava la lipoperossidazione rispettivamente del 57%, del 60% e del 74% (fig. 10).

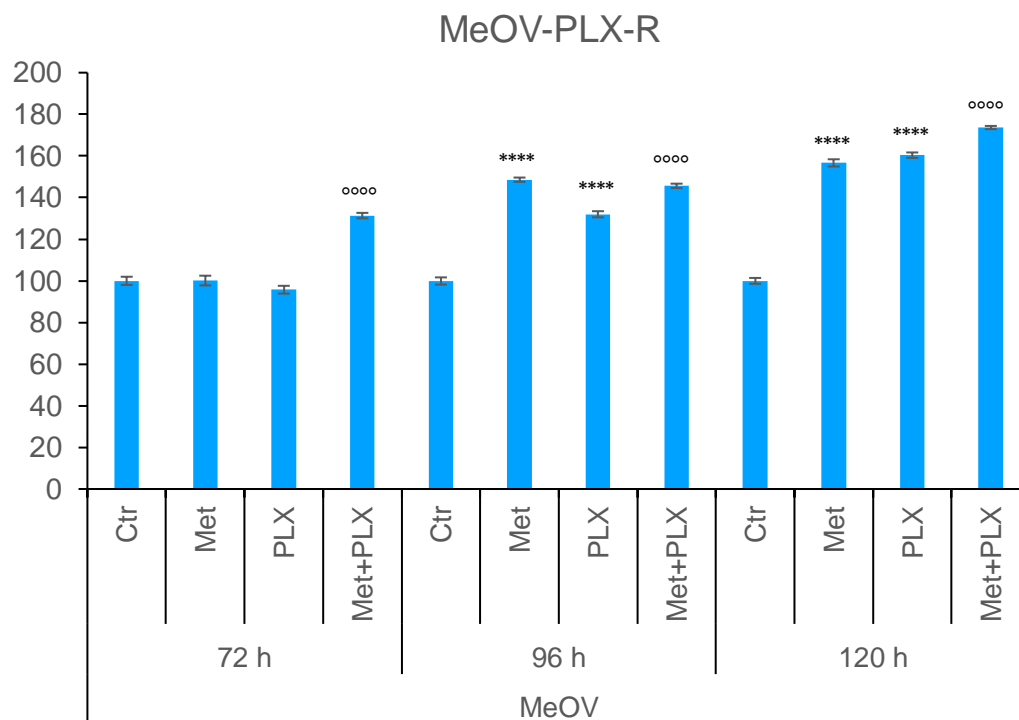


Figura 10. Il trattamento combinato potenzia l'effetto lipoperossidativo del PLX e della metformina.

Il grafico mostra il tasso di lipoperossidazione nelle cellule MeOV-PLX-R trattate con PLX4032 1.5 μ M e metformina 10 mM da soli o in combinazione per 72, 96 e 120 ore. La lipoperossidazione lipidica è stata valutata mediante il kit Image-iTM Lipid Peroxidation. I risultati sono stati riportati come variazione percentuale della lipoperossidazione misurata nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate (Ctr, 100%). L'istogramma riportato riassume i dati quantitativi delle medie \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti. **** p <0.0001 vs. Ctr; °°°° p <0.0001 vs. PLX.

4.3. Il trattamento con metformina da sola o in associazione con PLX4032 diminuisce la clonogenicità delle cellule MeOV-PLX-R

Le cellule sono state trattate per 72 ore con PLX4032 1.5 μ M e con metformina 10 mM da soli o in combinazione. Come si può osservare nella figura 11, il trattamento con PLX4032 aumentava notevolmente la

crescita ancoraggio-dipendente (clonogenicità) delle cellule, mentre il trattamento con metformina contrastava marcatamente la clonogenicità rispetto alle cellule non trattate. Sorprendentemente, il trattamento combinato era efficace nel ridurre marcatamente la clonogenicità indotta dal trattamento con il solo PLX.

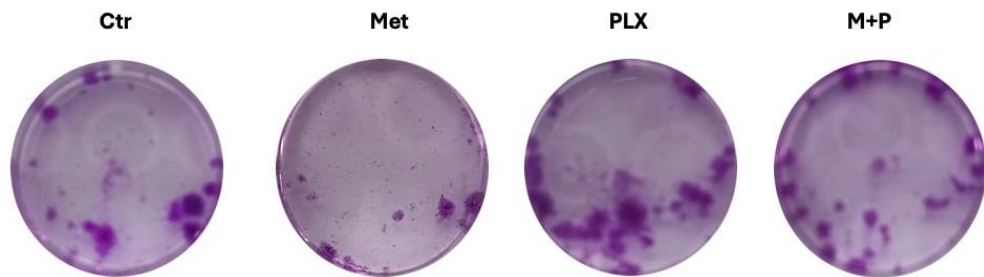


Figura 11. La metformina, somministrata da sola o in combinazione con il PLX4032, riduce il potenziale clonogenico delle cellule MeOV-PLX-R.

L'immagine mostra la clonogenicità delle linee cellulari MeOV-PLX-R trattate con PLX4032 1.5 μ M e metformina 10 mM da soli o in combinazione per 72 ore.

5. DISCUSSIONE

Il melanoma è una neoplasia altamente aggressiva che origina dalla trasformazione dei melanociti (Newcomer K et al., 2022).

Sebbene negli ultimi anni siano stati sviluppati numerosi approcci terapeutici per migliorare l'aspettativa di vita dei pazienti, le terapie ad oggi disponibili non sono del tutto in grado di contrastare il melanoma metastatico e l'insorgenza della chemioresistenza.

A tale riguardo infatti, il trattamento di elezione per pazienti con mutazione BRAF^{V600E} (Inamdar GS et al., 2010), responsabile dell'attivazione costitutiva della via di segnalazione MAPK-dipendente (Pratilas CA et al., 2010), è l'associazione combinata di inibitori BRAF (vemurafenib)/MEK (cobimetinib) (Hallmeyer S et al., 2017). Tuttavia, sfortunatamente, dopo 6-7 mesi di trattamento, un elevato numero di pazienti presenta una recidiva dovuta all'acquisizione di chemioresistenza (Swaika A et al., 2014; Wagle N et al., 2011).

Pertanto, indagare i meccanismi molecolari alla base della resistenza acquisita è fondamentale per migliorare l'efficacia della terapia e aumentare la sopravvivenza dei pazienti.

In tale contesto, studi precedentemente condotti dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto la tesi, hanno dimostrato che il metabolismo

ossidativo svolge un ruolo importante nell'insorgenza della resistenza del melanoma al PLX4032 (Garbarino O et al., 2023).

Per questa ragione sono attualmente in fase di sperimentazione clinica diverse strategie terapeutiche finalizzate a colpire il metabolismo delle cellule tumorali. In particolare, si è concentrata l'attenzione sulla modulazione di specifiche vie metaboliche come la glicolisi, il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e la fosforilazione ossidativa (Tennant DA et al., 2010; Martinez-Outschoorn UE et al., 2017).

I meccanismi responsabili di questa risposta adattativa non sono tuttavia ancora completamente chiariti e richiedono ulteriori studi per trovare nuovi bersagli specifici per migliorare l'efficacia della terapia attuale.

Sulla base di studi *in vitro* e *in vivo* (Delgado-Goñi T et al., 2020; Corazao-Rozas P et al., 2013), è stato ipotizzato che l'inibizione della fosforilazione ossidativa mediante farmaci, come la metformina, possa potenziare l'attività antitumorale degli inibitori di BRAF (Yuan P et al., 2013).

Sono già stati descritti in letteratura meccanismi antitumorali indiretti e diretti della metformina (Apampa B, 2012). Il meccanismo indiretto è correlato alla capacità della metformina di ridurre l'iperglicemia ed i livelli di insulina, ormone che promuove la crescita con effetti mitogenici (Cerezo M et al., 2015). I meccanismi diretti si basano sulla capacità del farmaco di indurre l'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 o S in alcuni

tipi di neoplasie come il cancro mammario, del pancreas, dell'endometrio, dell'ovaio ed il glioma (Ben Sahra I et al., 2008).

Inoltre, la metformina inibisce il complesso I della catena respiratoria determinando la riduzione della fosforilazione ossidativa con la conseguente diminuzione della produzione di ATP (Miller RA et al., 2010) e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Dowling RJ et al., 2007). Tale evento può indurre sia l'apoptosi sia l'attivazione dell'AMPK (Zhou G et al., 2001), che regola la crescita e la proliferazione cellulare, la polarità cellulare, l'apoptosi e l'autofagia (Luo Z et al., 2010). I risultati ottenuti nel presente studio hanno confermato l'importanza di un efficiente metabolismo ossidativo nel mantenimento della chemioresistenza. Infatti, il trattamento combinato con PLX4032 e metformina è in grado di ridurre marcatamente la vitalità e la clonogenicità delle cellule MeOV-PLX-R.

A questo riguardo, alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento con metformina somministrata come singolo farmaco riduce marcatamente proliferazione, vitalità e potenziale tumorigenico di cellule di melanoma chemiosensibili (Martin MJ et al., 2012; Cerezo M et al., 2013; de Souza Neto FP et al., 2017) (Peppicelli S et al., 2016). Inoltre, sebbene altri studi abbiano riportato che la metformina potenzia l'effetto di farmaci inibitori di BRAF (Ryabaya O et al., 2019), i risultati ottenuti in questa tesi,

dimostrano, per la prima volta, la sua capacità di contrastare la proliferazione delle cellule chemioresistenti.

Non solo, i risultati presentati suggeriscono che l'attività sinergica dei farmaci combinati (PLX4032 + metformina) è potenzialmente correlata a meccanismi ossidativi come dimostrato dall'incremento della perossidazione lipidica. Tale risultato è in accordo con il fatto che la metformina induce stress ossidativo nelle cellule di melanoma determinando un calo degli antiossidanti intracellulari ed un conseguente un aumento della lipoperossidazione di membrana (de Souza Neto FP et al., 2017). Sulla base di tali risultati e della più recente letteratura (Gu D et al., 2025) emerge il potenziale ruolo della metformina nell'indurre ferroptosi, una forma di morte programmata caratterizzata dalla perossidazione lipidica e deplezione di glutathione, il più importante antiossidante non enzimatico intracellulare. Pertanto, studi futuri saranno indirizzati a chiarire se l'azione citotossica del trattamento combinato sia attribuibile all'induzione di ferroptosi.

Inoltre, la capacità del trattamento combinato di ridurre la vitalità e arrestare la crescita clonogica evidenzia una vulnerabilità metabolica del melanoma metastatico resistente che potrebbe essere sfruttata per un trattamento terapeutico mirato. Sebbene ad oggi non siano stati ancora riportati studi clinici di trattamenti combinati con metformina ed inibitori di BRAF, esistono studi clinici in cui la metformina è stata

somministrata in combinazione con inibitori di tirosin-chinasi nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (Li L et al., 2019).

Alla luce dei risultati qui presentati, l'associazione tra metformina ed inibitori di BRAF potrebbe rappresentare un campo di indagine per future ricerche cliniche nel melanoma. Inoltre, essendo entrambi farmaci già autorizzati ed utilizzati in clinica, l'eventuale sviluppo di studi combinati potrebbe essere facilitato rispetto alla sperimentazione di molecole totalmente nuove.

6. BIBLIOGRAFIA

Al Hmada Y, Brodell RT, Kharouf N, Flanagan TW, Alamodi AA, Hassan SY, Shalaby H, Hassan SL, Haikel Y, Megahed M, Santourlidis S, Hassan M. Mechanisms of Melanoma Progression and Treatment Resistance: Role of Cancer Stem-like Cells. *Cancers (Basel)*. 2024 Jan 22;16(2):470. doi: 10.3390/cancers16020470.

Amaria RN, Reuben A, Cooper ZA, Wargo JA. Update on use of aldesleukin for treatment of high-risk metastatic melanoma. *Immunotargets Ther*. 2015 Apr 7;4:79-89. doi: 10.2147/ITT.S61590.

American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma; Tsao H, Olazagasti JM, Cordero KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, Chren MM, Sober AJ, Tegeler C, Bhushan R, Begolka WS. Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Apr;72(4):717-23. doi: 10.1016/j.jaad.2015.01.025.

American Joint Committee on Cancer. Melanoma of the skin staging, 7th edition. Chicago: AJCC; 2009. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/documents/melanomasmall.pdf>. Accessed August 17, 2020.

Apampa B. Pharmacology and safe prescribing of metformin. *Nurse Prescr*. 2012;10(12):597–602. doi:10.12968/npre.2012.10.12.597.

Aplin AE, Kaplan FM, Shao Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011 Sep;131(9):1817-20. doi: 10.1038/jid.2011.147.

Ariyan CE, Brady MS, Siegelbaum RH, Hu J, Bello DM, Rand J, Fisher C, Lefkowitz RA, Panageas KS, Pulitzer M, Vignali M, Emerson R, Tipton C, Robins H, Merghoub T, Yuan J, Jungbluth A, Blando J, Sharma P, Rudensky AY, Wolchok JD, Allison JP. Robust Antitumor Responses Result from Local Chemotherapy and CTLA-4 Blockade. *Cancer Immunol Res*. 2018 Feb;6(2):189-200. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0356.

Ascierto PA, Palmieri G. Adjuvant therapy of cutaneous melanoma. *Lancet*. 1999 Jan 23;353(9149):328. doi: 10.1016/s0140-6736(05)74894-7.

Bailey CM, Morrison JA, Kulesa PM. Melanoma revives an embryonic migration program to promote plasticity and invasion. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 Sep;25(5):573-83. doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.01025.x.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799.

Ballantyne AD, Garnock-Jones KP. Dabrafenib: first global approval. *Drugs*. 2013 Aug;73(12):1367-76. doi: 10.1007/s40265-013-0095-2.

Barnhill RL, Roush GC, Ernstoff MS, Kirkwood JM. Interclinician agreement on the recognition of selected gross morphologic features of pigmented lesions. *Studies of melanocytic nevi V. J Am Acad Dermatol*. 1992 Feb;26(2 Pt 1):185-90. doi: 10.1016/0190-9622(92)70023-9.

Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, Bartek J. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res*. 1996 Dec 1;56(23):5475-83.

Bedikian AY, Johnson MM, Warneke CL, Papadopoulos NE, Kim K, Hwu WJ, McIntyre S, Hwu P. Prognostic factors that determine the long-term survival of patients with unresectable metastatic melanoma. *Cancer Invest*. 2008 Jul;26(6):624-33. doi: 10.1080/07357900802027073.

Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through

a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*. 2008 Jun 5;27(25):3576-86. doi: 10.1038/sj.onc.1211024. Epub 2008 Jan 21. PMID: 18212742.

Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Feb;21(1):27-38. doi: 10.1111/j.1755-148X.2007.00433.x.

Berk-Krauss J, Stein JA, Weber J, Polsky D, Geller AC. New Systematic Therapies and Trends in Cutaneous Melanoma Deaths Among US Whites, 1986-2016. *Am J Public Health*. 2020 May;110(5):731-733. doi: 10.2105/AJPH.2020.305567.

Berwick M, MacArthur J, Orlow I, Kanetsky P, Begg CB, Luo L, Reiner A, Sharma A, Armstrong BK, Kricke A, Cust AE, Marrett LD, Gruber SB, Anton-Culver H, Zanetti R, Rosso S, Gallagher RP, Dwyer T, Venn A, Busam K, From L, White K, Thomas NE; GEM Study Group. MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 May;27(3):485-8. doi: 10.1111/pcmr.12215.

Blank CU, Rozeman EA, Fanchi LF, Sikorska K, van de Wiel B, Kvistborg P, Krijgsman O, van den Braber M, Philips D, Broeks A, van Thienen JV, Mallo HA, Adriaansz S, Ter Meulen S, Pronk LM, Grijpink-Ongering LG, Bruining A, Gittelman RM, Warren S, van Tinteren H, Peeper DS, Haanen JBAG, van Akkooi ACJ, Schumacher TN. Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat Med*. 2018 Nov;24(11):1655-1661. doi: 10.1038/s41591-018-0198-0.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10124-8. doi: 10.1073/pnas.88.22.10124.

Brown AL, Arroyo VM, Agrusa JE, Scheurer ME, Gramatges MM, Lupo PJ. Survival disparities for second primary malignancies diagnosed

among childhood cancer survivors: A population-based assessment. *Cancer*. 2019 Oct 15;125(20):3623-3630. doi: 10.1002/cnrc.32356.

Burmeister BH, Henderson MA, Ainslie J, Fisher R, Di Iulio J, Smithers BM, Hong A, Shannon K, Scolyer RA, Carruthers S, Coventry BJ, Babington S, Duprat J, Hoekstra HJ, Thompson JF. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jun;13(6):589-97. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70138-9.

Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1681-96. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044.

Capparelli C, Purwin TJ, Glasheen M, Caksa S, Tiago M, Wilski N, Pomante D, Rosenbaum S, Nguyen MQ, Cai W, Franco-Barraza J, Zheng R, Kumar G, Chervoneva I, Shimada A, Rebecca VW, Snook AE, Hookim K, Xu X, Cukierman E, Herlyn M, Aplin AE. Targeting SOX10-deficient cells to reduce the dormant-invasive phenotype state in melanoma. *Nat Commun*. 2022 Mar 16;13(1):1381. doi: 10.1038/s41467-022-28801-y.

Carli P, De Giorgi V, Palli D, Maurichi A, Mulas P, Orlandi C, Imberti G, Stanganelli I, Soma P, Dioguardi D, Catricala C, Betti R, Paoli S, Bottoni U, Lo Scocco G, Scalvenzi M, Giannotti B. Self-detected cutaneous melanomas in Italian patients. *Clin Exp Dermatol*. 2004 Nov;29(6):593-6. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01628.x.

Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick AC, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian BC, Schwartz GK. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2327-34. doi: 10.1001/jama.2011.746.

Cerezo M, Tichet M, Abbe P, Ohanna M, Lehraiki A, Rouaud F, Allegra M, Giaccherio D, Bahadoran P, Bertolotto C, Tartare-Deckert S, Ballotti R, Rocchi S. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis

development in AMPK/p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther.* 2013 Aug;12(8):1605-15. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1226-T. Epub 2013 Jun 5.

Cerezo M, Tomic T, Ballotti R, Rocchi S. Is it time to test biguanide metformin in the treatment of melanoma? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Jan;28(1):8-20. doi: 10.1111/pcmr.12267. Epub 2014 Jun 26.

Chang C, Murzaku EC, Penn L, Abbasi NR, Davis PD, Berwick M, Polsky D. More skin, more sun, more tan, more melanoma. *Am J Public Health.* 2014 Nov;104(11):e92-9. doi: 10.2105/AJPH.2014.302185

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30;364(26):2507-16. doi: 10.1056/NEJMoa1103782.

Chesney J, Puzanov I, Collichio F, Singh P, Milhem MM, Glaspy J, Hamid O, Ross M, Friedlander P, Garbe C, Logan TF, Hauschild A, Lebbé C, Chen L, Kim JJ, Gansert J, Andtbacka RHI, Kaufman HL. Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. *J Clin Oncol.* 2018 Jun 10;36(17):1658-1667. doi: 10.1200/JCO.2017.73.7379.

Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006 Aug 15;20(16):2149-82. doi: 10.1101/gad.1437206.

Ciażyńska M, Kamińska-Winciorek G, Lange D, Lewandowski B, Reich A, Sławińska M, Pabianek M, Szczepaniak K, Hankiewicz A, Ułańska M, Morawiec J, Błasińska-Morawiec M, Morawiec Z, Piekarski J, Nejc D, Brodowski R, Zaryczańska A, Sobjanek M, Nowicki RJ, Owczarek W, Słowińska M, Wróbel K, Bieniek A, Woźniacka A, Skibińska M, Narbutt

J, Niemczyk W, Ciężyński K, Lesiak A. The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. *Sci Rep.* 2021 Feb 22;11(1):4337. doi: 10.1038/s41598-021-83502-8. Erratum in: *Sci Rep.* 2021 Jul 28;11(1):15705. doi: 10.1038/s41598-021-94435-7.

Clark ME, Rizos H, Pereira MR, McEvoy AC, Marsavela G, Calapre L, Meehan K, Ruhen O, Khattak MA, Meniawy TM, Long GV, Carlino MS, Menzies AM, Millward M, Ziman M, Gray ES. Detection of BRAF splicing variants in plasma-derived cell-free nucleic acids and extracellular vesicles of melanoma patients failing targeted therapy therapies. *Oncotarget.* 2020 Nov 3;11(44):4016-4027. doi: 10.18632/oncotarget.27790.

Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996 Apr 1;77(7):1303-10. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5.

Coit DG, Thompson JA, Albertini MR, Barker C, Carson WE, Contreras C, Daniels GA, DiMaio D, Fields RC, Fleming MD, Freeman M, Galan A, Gastman B, Guild V, Johnson D, Joseph RW, Lange JR, Nath S, Olszanski AJ, Ott P, Gupta AP, Ross MI, Salama AK, Skitzki J, Sosman J, Swetter SM, Tanabe KK, Wuthrick E, McMillian NR, Engh AM. Cutaneous Melanoma, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019 Apr 1;17(4):367-402. doi: 10.6004/jnccn.2019.0018.

Coit DG, Thompson JA, Algazi A, Andtbacka R, Bichakjian CK, Carson WE 3rd, Daniels GA, DiMaio D, Fields RC, Fleming MD, Gastman B, Gonzalez R, Guild V, Johnson D, Joseph RW, Lange JR, Martini MC, Materin MA, Olszanski AJ, Ott P, Gupta AP, Ross MI, Salama AK, Skitzki J, Swetter SM, Tanabe KK, Torres-Roca JF, Trisal V, Urist MM, McMillian N, Engh A. NCCN Guidelines Insights: Melanoma, Version 3.2016. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016 Aug;14(8):945-58. doi: 10.6004/jnccn.2016.0101.

Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, André F, Jonneaux A, Scalbert C, Garçon G, Malet-Martino M, Balayssac S, Rocchi S, Savina A, Formstecher P, Mortier L, Kluza J, Marchetti P. Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget*. 2013 Nov;4(11):1986-98. doi: 10.18632/oncotarget.1420.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2135-47. doi: 10.1056/NEJMoa050092.

Cust AE, Armstrong BK, Goumas C, Jenkins MA, Schmid H, Hopper JL, Kefford RF, Giles GG, Aitken JF, Mann GJ. Sunbed use during adolescence and early adulthood is associated with increased risk of early-onset melanoma. *Int J Cancer*. 2011 May 15;128(10):2425-35. doi: 10.1002/ijc.25576.

Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 27;21(13):4576. doi: 10.3390/ijms21134576.

D'Arcy ME, Coghill AE, Lynch CF, Koch LA, Li J, Pawlish KS, Morris CR, Rao C, Engels EA. Survival after a cancer diagnosis among solid organ transplant recipients in the United States. *Cancer*. 2019 Mar 15;125(6):933-942. doi: 10.1002/cncr.31782.

Davar D, Wang H, Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade JJ, Ka M, Menna C, Rose A, Sander C, Borhani AA, Karunamurthy A, Tarhini AA, Tawbi HA, Zhao Q, Moreno BH, Ebbinghaus S, Ibrahim N, Kirkwood JM, Zarour HM. Phase Ib/II Study of Pembrolizumab and Pegylated-Interferon Alfa-2b in Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2018 Oct 25;36(35):JCO1800632. doi: 10.1200/JCO.18.00632.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R,

Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. doi: 10.1038/nature00766.

de Souza Neto FP, Bernardes SS, Marinello PC, Melo GP, Luiz RC, Cecchini R, Cecchini AL. Metformin: oxidative and proliferative parameters in-vitro and in-vivo models of murine melanoma. *Melanoma Res*. 2017 Dec;27(6):536-544. doi: 10.1097/CMR.0000000000000391.

Delgado-Goñi T, Galobart TC, Wantuch S, Normantaite D, Leach MO, Whittaker SR, Belouèche-Babari M. Increased inflammatory lipid metabolism and anaplerotic mitochondrial activation follow acquired resistance to vemurafenib in BRAF-mutant melanoma cells. *Br J Cancer*. 2020 Jan;122(1):72-81. doi: 10.1038/s41416-019-0628-x. Epub 2019 Dec 10.

Diazzi S, Tartare-Deckert S, Deckert M. The mechanical phenotypic plasticity of melanoma cell: an emerging driver of therapy cross-resistance. *Oncogenesis*. 2023;12(1):7. doi:10.1038/s41389-023-00452-x.

Doma V, Barbai T, Beleaua MA, Kovalszky I, Rásó E, Tímár J. KIT Mutation Incidence and Pattern of Melanoma in Central Europe. *Pathol Oncol Res*. 2020 Jan;26(1):17-22. doi: 10.1007/s12253-019-00788-w.

Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*. 2003 Aug 5;42(30):9221-6. doi: 10.1021/bi034593c.

Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Nov 15;67(22):10804-12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2310. PMID: 18006825.

Drummen GP, van Liebergen LC, Op den Kamp JA, Post JA. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 15;33(4):473-90. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00848-1.

Dulgar O, Kutuk T, Eroglu Z. Mechanisms of Resistance to BRAF-Targeted Melanoma Therapies. *Am J Clin Dermatol.* 2021 Jan;22(1):1-10. doi: 10.1007/s40257-020-00572-6.

Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Jun;23(3):501-13, ix. doi: 10.1016/j.hoc.2009.03.013.

Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF. Overcoming apoptosis deficiency of melanoma—hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat.* 2007 Dec;10(6):218-34. doi: 10.1016/j.drug.2007.09.001.

Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, Lebbé C, Ferraresi V, Smylie M, Weber JS, Maio M, Bastholt L, Mortier L, Thomas L, Tahir S, Hauschild A, Hassel JC, Hodi FS, Taitt C, de Pril V, de Schaetzen G, Suci S, Testori A. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med.* 2016 Nov 10;375(19):1845-1855. doi: 10.1056/NEJMoa1611299. Epub 2016 Oct 7. Erratum in: *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2185. doi: 10.1056/NEJMs180040.

Eigentler TK, Buettner PG, Leiter U, Garbe C; Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. 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 1;22(21):4376-83. doi: 10.1200/JCO.2004.03.075.

Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005 Jun 4;330(7503):1304-5. doi: 10.1136/bmj.38415.708634.F7.

Fischer Y, Thomas J, Rösen P, Kammermeier H. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology*. 1995 Feb;136(2):412-20. doi: 10.1210/endo.136.2.7835271.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA 3rd, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. 2012 Nov 1;367(18):1694-703. doi: 10.1056/NEJMoa1210093.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):809-19. doi: 10.1056/NEJMoa1002011.

Florian S, Mitchison TJ. Anti-Microtubule Drugs. *Methods Mol Biol*. 2016;1413:403-21. doi: 10.1007/978-1-4939-3542-0_25.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégorier JP. Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 2001 Aug 15;62(4):439-46. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00679-7.

Furfaro AL, Loi G, Ivaldo C, Passalacqua M, Pietra G, Mann GE, Nitti M. HO-1 Limits the Efficacy of Vemurafenib/PLX4032 in BRAF^{V600E} Mutated

Melanoma Cells Adapted to Physiological Normoxia or Hypoxia. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jun 14;11(6):1171. doi: 10.3390/antiox11061171.

Garbarino O, Valenti GE, Monteleone L, Pietra G, Mingari MC, Benzi A, Bruzzone S, Ravera S, Leardi R, Farinini E, Vernazza S, Grottoli M, Marengo B, Domenicotti C. PLX4032 resistance of patient-derived melanoma cells: crucial role of oxidative metabolism. *Front Oncol*. 2023 Jul 18;13:1210130. doi: 10.3389/fonc.2023.1210130.

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):117-22. doi: 10.1038/nature03664.

Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF; for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform. 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):472-492. doi: 10.3322/caac.21409.

Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*. 2010 Jul;33(7):1674-85. doi: 10.2337/dc10-0666.

Giunta EF, Arrichiello G, Curvietto M, Pappalardo A, Bosso D, Rosanova M, Diana A, Giordano P, Petrillo A, Federico P, Fabozzi T, Parola S, Riccio V, Mucci B, Vanella V, Festino L, Daniele B, Ascierio PA, Ottaviano M, On Behalf Of Scito Youth. Epigenetic Regulation in Melanoma: Facts and Hopes. *Cells*. 2021 Aug 11;10(8):2048. doi: 10.3390/cells10082048.

Gonzalez A. Sentinel Lymph Node Biopsy: Past and Present Implications for the Management of Cutaneous Melanoma with Nodal Metastasis. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Nov;19(Suppl 1):24-30. doi: 10.1007/s40257-018-0379-0.

Gordon R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*. 2013 Aug;29(3):160-9. doi: 10.1016/j.soncn.2013.06.002.

Grünhagen DJ, de Wilt JH, van Geel AN, Eggermont AM. Isolated limb perfusion for melanoma patients--a review of its indications and the role of tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Surg Oncol*. 2006 May;32(4):371-80. doi: 10.1016/j.ejso.2006.01.015.

Gu D, Sun Y, Wang J, Sun J, Lou H, Kang W. Metformin regulates ferroptosis in Skin cutaneous melanoma via ATF3/NRF2 axis. *Cancer Genet*. 2025 Jun;294-295:136-144. doi: 10.1016/j.cancergen.2025.04.006. Epub 2025 Apr 26.

Guida M, Tommasi S, Strippoli S, Natalicchio MI, De Summa S, Pinto R, Cramarossa A, Albano A, Pisconti S, Aieta M, Ridolfi R, Azzariti A, Guida G, Lorusso V, Colucci G. The search for a melanoma-tailored chemotherapy in the new era of personalized therapy: a phase II study of chemo-modulating temozolomide followed by fotemustine and a cooperative study of GOIM (Gruppo Oncologico Italia Meridionale). *BMC Cancer*. 2018 May 10;18(1):552. doi: 10.1186/s12885-018-4479-2.

Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Mar;88(3):1323-32. doi: 10.1210/jc.2002-021394. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jan;89(1):434.

Guo W, Wang H, Li C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Dec 20;6(1):424. doi: 10.1038/s41392-021-00827-6.

Hallmeyer S, Gonzalez R, Lawson DH, Cranmer LD, Linette GP, Puzanov I, Taback B, Cowey CL, Ribas A, Daniels GA, Moore T, Gibney GT, Tawbi H, Whitman E, Lee G, Mun Y, Liu S, Hamid O. Vemurafenib treatment for patients with locally advanced, unresectable stage IIIc or metastatic melanoma and activating exon 15 BRAF mutations other than V600E. *Melanoma Res.* 2017 Dec;27(6):585-590. doi: 10.1097/CMR.0000000000000398.

Harrington KJ, Puzanov I, Hecht JR, Hodi FS, Szabo Z, Murugappan S, Kaufman HL. Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015;15(12):1389-403. doi: 10.1586/14737140.2015.1115725.

Hauschild A, Dummer R, Schadendorf D, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, Larkin J, Nyakas M, Dutriaux C, Haydon A, Robert C, Mortier L, Schachter J, Lesimple T, Plummer R, Dasgupta K, Haas T, Shilkrut M, Gasal E, Kefford R, Kirkwood JM, Long GV. 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.* 2018 Dec 10;36(35):3441-3449. doi: 10.1200/JCO.18.01219.

Herndon TM, Demko SG, Jiang X, He K, Gootenberg JE, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. U.S. Food and Drug Administration Approval: peginterferon-alfa-2b for the adjuvant treatment of patients with melanoma. *Oncologist.* 2012;17(10):1323-8. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0123.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010 Aug 19;363(8):711-23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466. Erratum in: *N Engl J Med.* 2010 Sep 23;363(13):1290.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stenke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):251-63. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024.

Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):650-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2491.

Hossain SM, Eccles MR. Phenotype Switching and the Melanoma Microenvironment; Impact on Immunotherapy and Drug Resistance. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 13;24(2):1601. doi: 10.3390/ijms24021601.

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. doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.029.

International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*. 2007 Mar 1;120(5):1116-22. doi: 10.1002/ijc.22453. Erratum in: *Int J Cancer*. 2007 Jun 1;120(11):2526.

Jaune E, Rocchi S. Metformin: Focus on Melanoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Aug 21;9:472. doi: 10.3389/fendo.2018.00472.

Jiang BS, Beasley GM, Speicher PJ, Mosca PJ, Morse MA, Hanks B, Salama A, Tyler DS. Immunotherapy following regional chemotherapy

treatment of advanced extremity melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2014 Aug;21(8):2525-31. doi: 10.1245/s10434-014-3671-0.

Jiang G, Li RH, Sun C, Liu YQ, Zheng JN. Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Dec 11;9(12):e111920. doi: 10.1371/journal.pone.0111920.

Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs--phenanthriplatin. *Anticancer Res*. 2014 Jan;34(1):471-6.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005 Apr 29;18(3):283-93. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.027.

Karimkhani C, Green AC, Nijsten T, Weinstock MA, Dellavalle RP, Naghavi M, Fitzmaurice C. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*. 2017 Jul;177(1):134-140. doi: 10.1111/bjd.15510.

Keller HR, Zhang X, Li L, Schaidler H, Wells JW. Overcoming resistance to targeted therapy with immunotherapy and combination therapy for metastatic melanoma. *Oncotarget*. 2017 Jun 16;8(43):75675-75686. doi: 10.18632/oncotarget.18523.

Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, Gogas HJ. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3445-55. doi: 10.1200/JCO.2007.14.6423.

Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Apr;1871(2):313-322. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.02.002.

Lafin JT, Sarsour EH, Kalen AL, Wagner BA, Buettner GR, Goswami PC. Methylseleninic Acid Induces Lipid Peroxidation and Radiation Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 8;20(1):225. doi: 10.3390/ijms20010225.

Lam CJ, Curtis RE, Dores GM, Engels EA, Caporaso NE, Polliack A, Warren JL, Young HA, Levine PH, Elmi AF, Fraumeni JF Jr, Tucker MA, Morton LM. Risk Factors for Melanoma Among Survivors of Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2015 Oct 1;33(28):3096-104. doi: 10.1200/JCO.2014.60.2094.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):23-34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030. Erratum in: *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2185. doi: 10.1056/NEJMx180040.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hogg D, Hill A, Márquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schöffski P, Carlino MS, Lebbé C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bastholt L, Rizzo JI, Balogh A, Moshyk A, Hodi FS, Wolchok JD. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2019 Oct 17;381(16):1535-1546. doi: 10.1056/NEJMoa1910836.

Lasithiotakis K, Leiter U, Krüger-Krasagakis S, Tosca A, Garbe C. Comparative analysis of incidence and clinical features of cutaneous malignant melanoma in Crete (Greece) and southern Germany (central Baden-Württemberg). *Br J Dermatol.* 2006 Jun;154(6):1123-7. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07163.x.

Law MH, Macgregor S, Hayward NK. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. *J Invest Dermatol.* 2012 Jul;132(7):1763-74. doi: 10.1038/jid.2012.75.

Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortés ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013 Jul 11;499(7457):214-218. doi: 10.1038/nature12213.

Lee B, Sandhu S, McArthur G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2015 Mar;27(2):141-50. doi: 10.1097/CCO.000000000000159.

Lee JJ, Murphy GF, Lian CG. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. *Lab Invest.* 2014 Aug;94(8):822-38. doi: 10.1038/labinvest.2014.87.

Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Raber M, Benjamin RS. A phase II trial of taxol in metastatic melanoma. *Cancer.* 1990;65(11):2478-2481. doi:10.1002/1097-0142(19900601)65:11<2478::AID-CNCR2820651114>3.0.CO;2-S

Li L, Jiang L, Wang Y, Zhao Y, Zhang XJ, Wu G, Zhou X, Sun J, Bai J, Ren B, Tian K, Xu Z, Xiao HL, Zhou Q, Han R, Chen H, Wang H, Yang Z, Gao C, Cai S, He Y. Combination of Metformin and Gefitinib as First-Line Therapy for Nondiabetic Advanced NSCLC Patients with EGFR Mutations: A Randomized, Double-Blind Phase II Trial. *Clin Cancer Res.*

2019 Dec 1;25(23):6967-6975. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0437. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31413010.

Long GV, Dummer R, Andtbacka RH. Follow-up analysis of MASTERKEY-265 phase 1b (ph1b) study of talimogene laherparepvec (T-VEC) in combination (combo) with pembrolizumab (pembro) in patients (pts) with unresectable stage IIIB-IVM1c melanoma (MEL). *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 Jan;32(1):133-134. doi: 10.1111/pcmr.12738.

Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, Larkin J, Nyakas M, Dutriaux C, Haydon A, Robert C, Mortier L, Schachter J, Schadendorf D, Lesimple T, Plummer R, Ji R, Zhang P, Mookerjee B, Legos J, Kefford R, Dummer R, Kirkwood JM. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 2017 Nov 9;377(19):1813-1823. doi: 10.1056/NEJMoa1708539. Epub 2017 Sep 10.

Long GV, Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2023 Aug 5;402(10400):485-502. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8. Epub 2023 Jul 24. Erratum in: *Lancet.* 2023 Aug 5;402(10400):450. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01581-7.

Lozada JR, Geyer FC, Selenica P, Brown D, Alemar B, Merghoub T, Berger MF, Busam KJ, Halpern AC, Weigelt B, Reis-Filho JS, Hollmann TJ. Massively parallel sequencing analysis of benign melanocytic naevi. *Histopathology.* 2019 Jul;75(1):29-38. doi: 10.1111/his.13843.

Lugowska I, Koseła-Paterczyk H, Kozak K, Rutkowski P. Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *Onco Targets Ther.* 2015 Aug 25;8:2251-9. doi: 10.2147/OTT.S72951.

Luo Z, Zang M, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol.* 2010 Mar;6(3):457-70. doi: 10.2217/fon.09.174.

MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009 Aug;20 Suppl 6(Suppl 6):vi1-7. doi: 10.1093/annonc/mdp252.

Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Dec 17;95(24):1878-90. doi: 10.1093/jnci/djg123.

Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2013 Jun;32(1-2):303-15. doi: 10.1007/s10555-012-9415-3.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2007 Mar;82(3):364-80. doi: 10.4065/82.3.364.

Martin MJ, Hayward R, Viros A, Marais R. Metformin accelerates the growth of BRAF V600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A. *Cancer Discov*. 2012 Apr;2(4):344-55. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0280. Epub 2012 Mar 31.

Martinez AM, Kim A, Yang WS. Detection of Ferroptosis by BODIPYTM 581/591 C11. *Methods Mol Biol*. 2020;2108:125-130. doi: 10.1007/978-1-0716-0247-8_11.

Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Jan;14(1):11-31. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.60. Epub 2016 May 4. Erratum in: *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Feb;14(2):113. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.1.

McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbé C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day SJ, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dréno B, Sosman JA, Flaherty KT, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* 2014 Mar;15(3):323-32. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70012-9.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006 Jul 6;355(1):51-65. doi: 10.1056/NEJMra052166.

Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Sep;69(5):363-385. doi: 10.3322/caac.21565.

Miller RA, Birnbaum MJ. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J Clin Invest.* 2010 Jul;120(7):2267-70. doi: 10.1172/JCI43661.

Monami M, Marchionni N, Mannucci E. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur J Endocrinol.* 2009 Jun;160(6):909-17. doi: 10.1530/EJE-09-0101.

Morrison C, Pabla S, Conroy JM, Nesline MK, Glenn ST, Dressman D, Papanicolau-Sengos A, Burgher B, Andreas J, Giamo V, Qin M, Wang Y, Lenzo FL, Omilian A, Bshara W, Zibelman M, Ghatalia P, Dragnev K, Shirai K, Madden KG, Tafe LJ, Shah N, Kasuganti D, de la Cruz-Merino L, Araujo I, Saenger Y, Bogardus M, Villalona-Calero M, Diaz Z, Day R, Eisenberg M, Anderson SM, Puzanov I, Galluzzi L, Gardner M, Ernstoff MS. Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden. *J Immunother Cancer.* 2018 May 9;6(1):32. doi: 10.1186/s40425-018-0344-8.

Najjar Y, McCurry D, Lin H, Lin Y, Davar D, Drabick JJ, et al. A phase I study of neoadjuvant combination immunotherapy in locally/regionally advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2019 May 20;37(15_suppl):9586. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.9586.

National Cancer Institute. Cobimetinib approved for advanced melanoma. NCI Cancer Currents Blog [Internet]. Bethesda (MD): NCI; 2015 Nov 25. Available from: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2015/cobimetinib-melanoma>.

Nazir, S.; Khan, M.U.A.; Al-Arjan, W.S.; Razak, S.I.A.; Javed, A.; Kadir, M.R.A. Nanocomposite Hydrogels for Melanoma Skin Cancer Care and Treatment: In-Vitro Drug Delivery, Drug Release Kinetics and Anti-Cancer Activities. *Arab. J. Chem*. 2021, 14,103120.

Newcomer K, Robbins KJ, Perone J, Hinojosa FL, Chen D, Jones S, Kaufman CK, Weiser R, Fields RC, Tyler DS. Malignant melanoma: evolving practice management in an era of increasingly effective systemic therapies. *Curr Probl Surg*. 2022 Jan;59(1):101030. doi: 10.1016/j.cpsurg.2021.101030.

Nigam S, Enshaie E, Smith J, Rai V. Chemoresistance in cutaneous melanoma: contemporary and future aspects. *Chin Clin Oncol*. 2025 Jun;14(3):34. doi: 10.21037/cco-25-9.

Olsen CM, Lane SW, Green AC. Increased risk of melanoma in patients with chronic lymphocytic leukaemia: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Melanoma Res*. 2016 Apr;26(2):188-94. doi: 10.1097/CMR.0000000000000219.

Omland SH, Gniadecki R, Hædersdal M, Helweg-Larsen J, Omland LH. Skin Cancer Risk in Hematopoietic Stem-Cell Transplant Recipients Compared With Background Population and Renal Transplant Recipients: A Population-Based Cohort Study. *JAMA Dermatol*. 2016 Feb;152(2):177-83. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.3902.

Ozao-Choy J, Lee DJ, Faries MB. Melanoma vaccines: mixed past, promising future. *Surg Clin North Am.* 2014 Oct;94(5):1017-30, viii. doi: 10.1016/j.suc.2014.07.005.

Pap EH, Drummen GP, Post JA, Rijken PJ, Wirtz KW. Fluorescent fatty acid to monitor reactive oxygen in single cells. *Methods Enzymol.* 2000;319:603-12. doi: 10.1016/s0076-6879(00)19056-1.

Pawlik TM, Ross MI, Johnson MM, Schacherer CW, McClain DM, Mansfield PF, Lee JE, Cormier JN, Gershenwald JE. Predictors and natural history of in-transit melanoma after sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg Oncol.* 2005 Aug;12(8):587-96. doi: 10.1245/ASO.2005.05.025.
PDQ Adult Treatment Editorial Board. Melanoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2024. Available from: <https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq>.

Pellerin L, Carrié L, Dufau C, Nieto L, Ségui B, Levade T, Riond J, Andrieu-Abadie N. Lipid metabolic Reprogramming: Role in Melanoma Progression and Therapeutic Perspectives. *Cancers (Basel).* 2020 Oct 27;12(11):3147. doi: 10.3390/cancers12113147.

Peppicelli S, Toti A, Giannoni E, Bianchini F, Margheri F, Del Rosso M, Calorini L. Metformin is also effective on lactic acidosis-exposed melanoma cells switched to oxidative phosphorylation. *Cell Cycle.* 2016 Jul 17;15(14):1908-18. doi: 10.1080/15384101.2016.1191706. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27266957; PMCID: PMC4968910.

Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res.* 2010 Jul 1;16(13):3329-34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3064. Epub 2010 May 14.

Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular

markers and therapeutic possibilities. *J Pathol.* 2019 Apr;247(5):539-551. doi: 10.1002/path.5213.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, Fagnoli MC. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008 Jun 15;122(12):2753-60. doi: 10.1002/ijc.23396.

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 2014 Nov-Dec;28(6):1005-11.

Reddy BY, Miller DM, Tsao H. Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer.* 2017 Jun 1;123(S11):2104-2117. doi: 10.1002/cncr.30593.

Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, Olszanski AJ, Malvey J, Cebon J, Fernandez E, Kirkwood JM, Gajewski TF, Chen L, Gorski KS, Anderson AA, Diede SJ, Lassman ME, Gansert J, Hodi FS, Long GV. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2017 Sep 7;170(6):1109-1119.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.027. Erratum in: *Cell.* 2018 Aug 9;174(4):1031-1032. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.035.

Rigel DS. Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2010 Dec;29(4):204-9. doi: 10.1016/j.sder.2010.10.005.

Robbins HA, Clarke CA, Arron ST, Tatalovich Z, Kahn AR, Hernandez BY, Paddock L, Yanik EL, Lynch CF, Kasiske BL, Snyder J, Engels EA. Melanoma Risk and Survival among Organ Transplant Recipients. *J Invest Dermatol.* 2015 Nov;135(11):2657-2665. doi: 10.1038/jid.2015.312.

Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I, Gogas H, Mandalá M, Haanen JBAG, Lebbé C, Mackiewicz A, Rutkowski P, Nathan PD, Ribas A, Davies MA, Flaherty KT, Burgess P, Tan M, Gasal E, Voi M, Schadendorf D, Long GV. Five-Year Outcomes with

Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2019 Aug 15;381(7):626-636. doi: 10.1056/NEJMoa1904059.

Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A; KEYNOTE-006 investigators. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Jun 25;372(26):2521-32. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.

Rubanov A, Berico P, Hernando E. Epigenetic Mechanisms Underlying Melanoma Resistance to Immune and Targeted Therapies. *Cancers (Basel).* 2022 Nov 28;14(23):5858. doi: 10.3390/cancers14235858.

Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, Kluger HM, Narayan D, Halaban R. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med.* 2010 Jul 14;8:67. doi: 10.1186/1479-5876-8-67.

Ryabaya O, Prokofieva A, Akasov R, Khochenkov D, Emelyanova M, Burov S, Markvicheva E, Inshakov A, Stepanova E. Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:2548-2560. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.109. Epub 2018 Dec 5.

Sabit H, Kaliyadan F, Menezes RG. Malignant melanoma: Underlying epigenetic mechanisms. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2020 Sep-Oct;86(5):475-481. doi: 10.4103/ijdv.IJDVL_791_19.

Shah P, He YY. Molecular regulation of UV-induced DNA repair. *Photochem Photobiol.* 2015 Mar-Apr;91(2):254-64. doi: 10.1111/php.12406.

Shirley M. Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs.* 2018 Aug;78(12):1277-1284. doi: 10.1007/s40265-018-0963-x.

Shitara D, Tell-Martí G, Badenas C, Enokihara MM, Alós L, Larque AB, Michalany N, Puig-Butille JA, Carrera C, Malveyh J, Puig S, Bagatin E. Mutational status of naevus-associated melanomas. *Br J Dermatol*. 2015 Sep;173(3):671-80. doi: 10.1111/bjd.13829.

Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3138-51. doi: 10.1038/sj.onc.1206454.

Sood S, Jayachandiran R, Pandey S. Current Advancements and Novel Strategies in the Treatment of Metastatic Melanoma. *Integr Cancer Ther*. 2021 Jan-Dec;20:1534735421990078. doi: 10.1177/1534735421990078.

Straume O, Akslen LA. Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas. *Cancer*. 1996 Sep 15;78(6):1211-9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960915)78:6<1211::AID-CNCR7>3.0.CO;2-C.

Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012 Jul 26;487(7408):500-4. doi: 10.1038/nature11183.

Strub T, Ballotti R, Bertolotto C. The “ART” of Epigenetics in Melanoma: From histone “Alterations, to Resistance and Therapies”. *Theranostics*. 2020;10(4):1777-1797. doi:10.7150/thno.36218

Sun J, Zager JS, Eroglu Z. Encorafenib/binimetinib for the treatment of BRAF-mutant advanced, unresectable, or metastatic melanoma: design, development, and potential place in therapy. *Onco Targets Ther*. 2018 Dec 14;11:9081-9089. doi: 10.2147/OTT.S171693.

Swaika A, Crozier JA, Joseph RW. Vemurafenib: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Jun 16;8:775-87. doi: 10.2147/DDDT.S31143.

Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, Guild V, Grant-Kels JM, Halpern AC, Johnson TM, Sober AJ, Thompson JA, Wisco OJ, Wyatt S, Hu S, Lamina T. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jan;80(1):208-250. doi: 10.1016/j.jaad.2018.08.055.

Switzer B, Puzanov I, Skitzki JJ, Hamad L, Ernstoff MS. Managing Metastatic Melanoma in 2022: A Clinical Review. *JCO Oncol Pract*. 2022 May;18(5):335-351. doi: 10.1200/OP.21.00686.

Tagliabue E, Gandini S, Bellocco R, Maisonneuve P, Newton-Bishop J, Polsky D, Lazovich D, Kanetsky PA, Ghiorzo P, Gruis NA, Landi MT, Menin C, Fagnoli MC, García-Borrón JC, Han J, Little J, Sera F, Raimondi S. *MC1R* variants as melanoma risk factors independent of at-risk phenotypic characteristics: a pooled analysis from the M-SKIP project. *Cancer Manag Res*. 2018 May 14;10:1143-1154. doi: 10.2147/CMAR.S155283.

Tanda ET, Vanni I, Boutros A, Andreotti V, Bruno W, Ghiorzo P, Spagnolo F. Current State of Target Treatment in BRAF Mutated Melanoma. *Front Mol Biosci*. 2020 Jul 14;7:154. doi: 10.3389/fmolb.2020.00154.

Tangella LP, Clark ME, Gray ES. Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021 Jan;1865(1):129736. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129736.

Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010 Apr;10(4):267-77. doi: 10.1038/nrc2817. Epub 2010 Mar 19.

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011 Jul;21(7):440-6. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.

Tímár J, Ladányi A. Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction. *Int J Mol Sci.* 2022 May 11;23(10):5384. doi: 10.3390/ijms23105384.

Tímár J, Vizkeleti L, Doma V, Barbai T, Rásó E. Genetic progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2016 Mar;35(1):93-107. doi: 10.1007/s10555-016-9613-5.

Torrens-Mas M, Cordani M, Mullappilly N, Pacchiana R, Riganti C, Palmieri M, Pons DG, Roca P, Oliver J, Donadelli M. Mutant p53 induces SIRT3/MnSOD axis to moderate ROS production in melanoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 2020 Jan 15;679:108219. doi: 10.1016/j.abb.2019.108219. Epub 2019 Dec 5.

Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X, Braas D, Grasso CS, Palaskas N, Ribas A, Graeber TG. 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. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.017.

US Food and Drug Administration. FDA approves dabrafenib plus trametinib for adjuvant treatment of melanoma with BRAF V600E or V600K mutations. FDA.gov [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; 2018 Apr 30. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-dabrafenib-plus-trametinib-adjuvant-treatment-melanoma-braf-v600e-or-v600k-mutations>.

Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd O, Caceres E, Cascinelli N, Claudio F, Ikonopisov RL, Javorski VV, Kirov S, Kulakowski A, Lacour J, Lejeune F, Mechl Z, Morabito A, Rodé I, Sergeev S, van Slooten E, Szczygiel K, Trapeznikov NN, Wagner RI. Delayed regional lymph node dissection in stage I melanoma of the skin of the lower extremities. *Cancer.* 1982 Jun 1;49(11):2420-30. doi: 10.1002/1097-0142(19820601)49:11<2420::aid-cnrc2820491133>3.0.co;2-2.

Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, Kehoe SM, Johannessen CM, Macconail LE, Hahn WC, Meyerson M, Garraway LA. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):3085-96. doi: 10.1200/JCO.2010.33.2312. Epub 2011 Mar 7. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2024 Mar 10;42(8):976. doi: 10.1200/JCO.24.00017.

Wang N, Ma T, Yu B. Targeting epigenetic regulators to overcome drug resistance in cancers. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Feb 17;8(1):69. doi: 10.1038/s41392-023-01341-7.

Weiss GR, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Zhao Y, Liu H, Slingluff CL Jr, Marincola FM, Wang E. Molecular insights on the peripheral and intratumoral effects of systemic high-dose rIL-2 (aldesleukin) administration for the treatment of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7440-50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1650.

Wichtowski M, Murawa D. Electrochemotherapy in the treatment of melanoma. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018;22(1):8-13. doi: 10.5114/wo.2018.74387.

Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, Agarwala SS, Akhurst TJ, Ariyan C, Balch CM, Berman BS, Cochran A, Delman KA, Gorman M, Kirkwood JM, Moncrieff MD, Zager JS, Lyman GH. Sentinel Lymph Node Biopsy and Management of Regional Lymph Nodes in Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018 Feb 1;36(4):399-413. doi: 10.1200/JCO.2017.75.7724.

Yamamoto S, Iwakuma T. Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function. *Cancers (Basel)*. 2018 Dec 20;11(1):4. doi: 10.3390/cancers11010004.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, Gartside M, Cust AE, Haq R, Harland M, Taylor JC, Duffy DL, Holohan K, Dutton-Regester K, Palmer JM, Bonazzi V, Stark MS, Symmons J, Law MH, Schmidt C, Lanagan C, O'Connor L, Holland EA,

Schmid H, Maskiell JA, Jetann J, Ferguson M, Jenkins MA, Kefford RF, Giles GG, Armstrong BK, Aitken JF, Hopper JL, Whiteman DC, Pharoah PD, Easton DF, Dunning AM, Newton-Bishop JA, Montgomery GW, Martin NG, Mann GJ, Bishop DT, Tsao H, Trent JM, Fisher DE, Hayward NK, Brown KM. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*. 2011 Nov 13;480(7375):99-103. doi: 10.1038/nature10630.

Yuan P, Ito K, Perez-Lorenzo R, Del Guzzo C, Lee JH, Shen CH, Bosenberg MW, McMahon M, Cantley LC, Zheng B. Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 5;110(45):18226-31. doi: 10.1073/pnas.1317577110. Epub 2013 Oct 21. PMID: 24145418; PMCID: PMC3831456.

Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, Hayward NK. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016 May;29(3):266-83. doi: 10.1111/pcmr.12459.

Zhong J, Yan W, Wang C, Liu W, Lin X, Zou Z, Sun W, Chen Y. BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies. *Curr Treat Options Oncol*. 2022 Nov;23(11):1503-1521. doi: 10.1007/s11864-022-01006-7. Erratum in: *Curr Treat Options Oncol*. 2022 Dec;23(12):1877-1878. doi: 10.1007/s11864-022-01038-z.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1167-74. doi: 10.1172/JCI13505.

Zuo Q, Liu J, Huang L, Qin Y, Hawley T, Seo C, Merlino G, Yu Y. AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene*. 2018 Jun;37(24):3275-3289. doi: 10.1038/s41388-018-0205-4.