



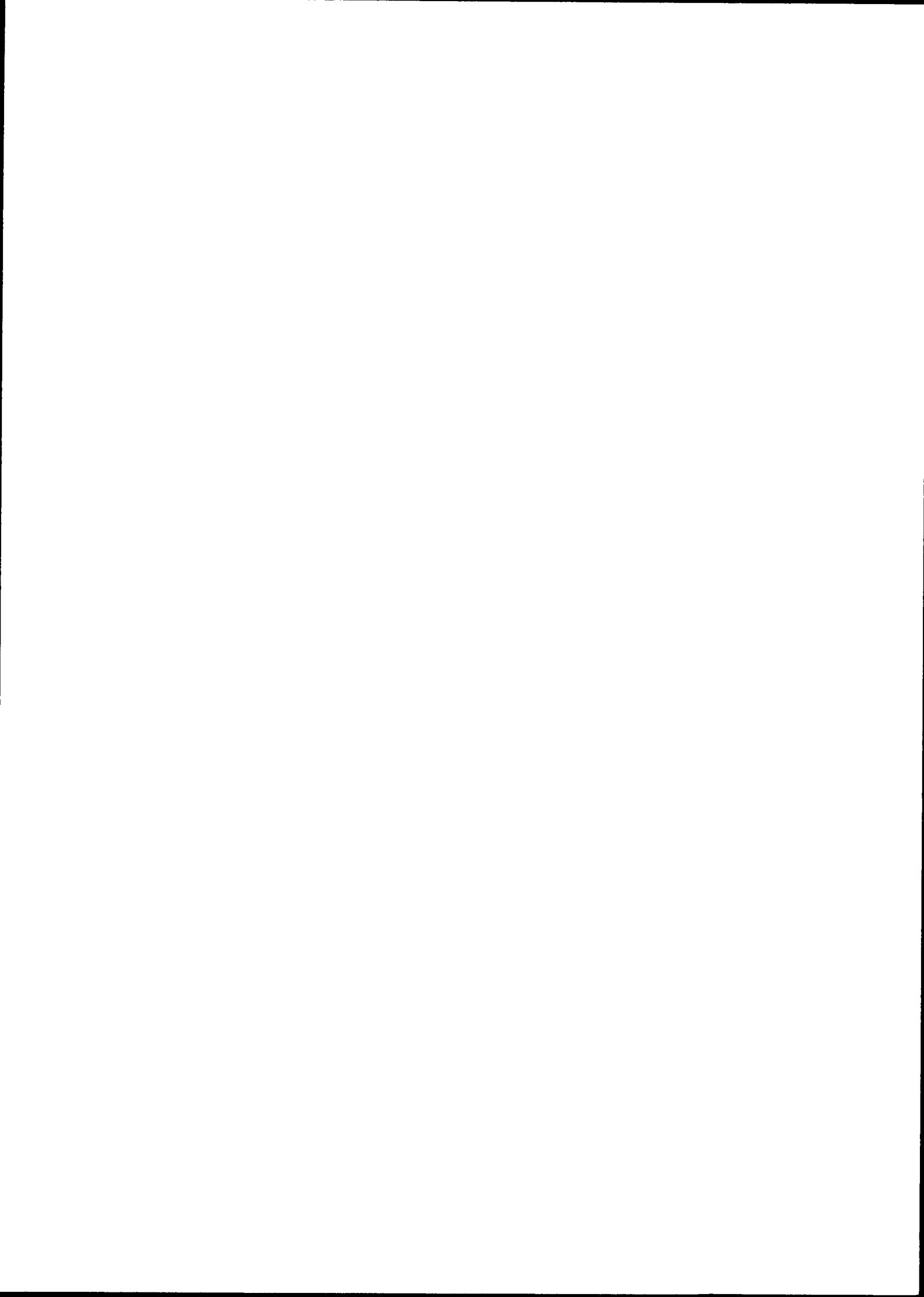
UNIVERSIDAD DE MURCIA

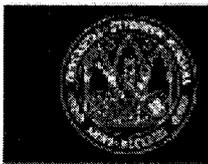
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR “B” E INMUNOLOGÍA**

**HLA y Expresión de Receptores NK
en Pacientes con Melanoma**

D^a Ana María García Alonso

2016





UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D.^a Pilar García Peñarrubia, Catedrática de Universidad del Área de Inmunología en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, autoriza como tutora académica:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HLA Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES NK EN PACIENTES CON MELANOMA ", realizada por D.^a ANA MARÍA GARCÍA ALONSO, bajo la dirección y supervisión de D.^a MARIA DEL ROCIO ÁLVAREZ LÓPEZ y D. JOSE ANTONIO CAMPILLO MARQUINA y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de noviembre de 2015

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines.

Fdo.: Pilar García Peñarrubia

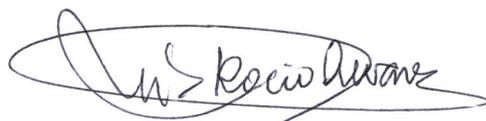


DÑA. MARIA ROCIO ALVAREZ LOPEZ, Doctora en Farmacia por la Universidad de Granada, Especialista en Inmunología, Jefe de Servicio Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca del Servicio Murciano de Salud,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HLA Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES NK EN PACIENTES CON MELANOMA", realizada por D^a. ANA MARIA GARCIA ALONSO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes firmo la presente en Murcia a 14 de Noviembre de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Rocio Alvarez', enclosed within a large, loopy oval scribble.

Fdo.: Dr. María Rocio Álvarez López



D. JOSE ANTONIO CAMPILLO MARQUINA, Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, Especialista en Inmunología, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca del Servicio Murciano de Salud, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HLA Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES NK EN PACIENTES CON MELANOMA", realizada por D^a. ANA MARIA GARCIA ALONSO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes firmo la presente en Murcia a 14 de Noviembre de 2015



Fdo.: Dr. Jose Antonio Campillo Marquina



*A los que tanto debo:
A mis padres,
A mis hermanas y hermano,
A mis compañeras y compañeros,
A mis amigas y amigos,
A quienes tanto añoro.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento más sincero a todas las personas que han colaborado para que este trabajo vea la luz.

A la Dra. Rocío Álvarez López por haber dirigido de forma inmejorable el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, por su dedicación y compromiso, por su afán investigador, por su generosidad y paciencia, por haber dirigido e impulsado la realización de este trabajo desde el comienzo y, sobre todas las cosas, por su cálida acogida cuando llegué a Murcia y por haberme regalado algo muy precioso para mí, su amistad.

Al Dr. Jose Antonio Campillo Marquina, por la dirección de esta tesis, por su ayuda, por su comprensión, por su generosidad y por su rigor científico. De hecho, gracias a su implicación y su ayuda desinteresada este proyecto ha llegado a su fin.

A la Dra. Pilar García Peñarrubia (Universidad de Murcia) por aceptar la tutoría de esta tesis y al Dr. Gonzalo Rubio Pedraza (Universidad de Murcia) por su amistad y por su generosa ayuda.

Al Servicio de Dermatología del HCUVA y muy especialmente a Dr. Jorge Martínez Escribano por su implicación en esta línea de investigación en melanoma desde sus comienzos, por el reclutamiento, clasificación y seguimiento de pacientes y por el tiempo que me ha dedicado para la redacción y corrección de esta memoria.

Mi agradecimiento a mis compañeros la Dra. Rosa Moya Quiles por su generosa ayuda tanto técnica como intelectual para el desarrollo de esta memoria y a los doctores Alfredo Minguela Puras y Manuel Muro Amador por sus consejos en el análisis crítico de estos resultados y por su colaboración durante todos estos años que llevamos trabajando juntos. También a los doctores Pedro Martínez García y Marcos García Pacheco por su apoyo en los trabajos de cada día.

A M^a del Carmen García Calatayud, a M^a José Sanchis, Jose Miguel Alemany por su excelente labor técnica en este trabajo pero, sobre todo, por tantos años compartidos, por haberme hecho fáciles y llevaderas las largas guardias de trasplante, y por su amistad y afecto.

Mi particular agradecimiento a las personas que trabajan conmigo en la Unidad de Inmunología Clínica e Inmunodeficiencias, a Toñi Bernal (TEL), a la Dra. Gema Salgado Cecilia, Erika Novoa (MIR) y, otra vez, a M. Carmen; a todas ellas por su gran profesionalidad, por su inquietud y compromiso, por su paciencia y generosidad para conmigo y por tratar a los pacientes con mimo y respeto.

A Ana Adame, Manoli López y Flori Villar, por su colaboración sincera y su buen hacer. No me olvido de las TEL y enfermeras que con su labor hicieron que el Servicio de Inmunología creciese y se consolidase y, sobre todo, por dar siempre lo mejor de sí mismas en favor de los pacientes.

A los Residentes de aquellos años que participaron muy activamente en la parte técnica en los comienzos de este estudio, Olga Montes, Natalia Guerra y, muy especialmente, a Luis Marín que también dedicó muchas horas a la discusión y elaboración de los datos. A los actuales residentes Galián, Gorka y Gema por su predisposición y esfuerzo.

Jose Miguel Bolarín por su ayuda en el análisis estadístico. A los investigadores que pasaron por el Servicio de Inmunología y, especialmente, a Annia Mrowiec y Lourdes Gimeno por su generosa colaboración, por su compromiso, por su laboriosidad y por su inestimable ayuda.

A Pepe Rodriguez, nuestro secretario, por su capacidad de trabajo, por su amabilidad y por saber regalar una sonrisa a tiempo.

En fin, a todos los miembros del Servicio de Inmunología por conseguir que sea un placer acudir al trabajo cada día.

Agradezco a los pacientes su generosidad y apoyo pues por su colaboración desinteresada se levantan, día a día, los cimientos de las ciencias biomédicas.

Mi amor y agradecimiento a mis padres, Honorio y Leonisa; a mis hermanos, Angelines, Mariano y Charo y a mis sobrinos por su amor incondicional, su respeto y su tolerancia.

Por último quiero agradecer a los que comparten metas conmigo y, muy especialmente, a mis amigos y amigas que han sido y son el maná de mi espíritu, por su amor, su paciencia, su generosidad y tolerancia.

Gracias a todos por hacerme la vida fácil, gracias por hacerme sonreír.

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones
y la fuente de vida de todo progreso.

Louis Pasteur

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La producción científica obtenida con los estudios realizados en pacientes de melanoma recogidos en esta memoria han sido:

PUBLICACIONES

1. Moya-Quiles MR, Martínez-Escribano J, Guerra-Pérez N, Muro M, Marín L, Campillo JA, Montes-Ares O, Frías J, Minguela A, García-Alonso AM, Lozano JA, Álvarez-López MR. Lack of association of between HLA-E polymorphism and primary cutaneous melanoma in Spanish patients. *J Dermatol Sci.* 2005, 40 (1): 62-64
2. Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Moya-Quiles MR, Marín LA, Muro M, Guerra N, Parrado A, Campos M, Frías JF, Minguela A, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. Natural killer receptors on CD8 T cells and natural killer cells from different HLA-C phenotypes in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (16): 4822-4831.
3. Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Muro M, Moya-Quiles R, Marín LA, Montes-Ares O, Guerra N, Sánchez-Pedreño P, Frías JF, Lozano JA, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. HLA class I and class II frequency in patients with cutaneous malignant melanoma from South-Eastern Spain: The role of HLA-C in disease prognosis. *Immunogenetics* 2006, 57 (12): 926-933

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACD	Ácido-citrato-dextrosa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (del inglés, <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AKT	Proto-oncogén 1 de timoma viral
APC	Aloficocianina
ARF	Marco de lectura alternativo
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BMP	Proteínas morfogénicas del hueso
CD	Cluster de diferenciación
CDKN2	Gen del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 2
CDKN2A	Quinasa inhibidora dependiente de ciclina 2A
CMV	Citomegalovirus
CMV	Citomegalovirus
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Células dendríticas
DCOR	Dopacromo oxidasa
DMID	Diabetes mellitus insulín-dependiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	Oxidación de la tirosina por la tirosinasa a 3,4 dihidroxifenilalanina
EA	Espondilitis anquilopoyética

EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FcRn	Receptor neonatal para el Fc
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPS	Factor de protección solar
Gly	Glicina
HFE	Gen HFE de la hemocromatosis
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HPC	Células progenitoras del sistema hematopoyético
HSP	Proteínas de shock térmico
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IC	Intervalo de confianza
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IGF-1	Factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina
IL	Interleuquina
Ile	Isoleucina
ILT	Tránsito de tipo inmunoglobulina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
INK4a	Inhibidor de la quinasa 4A
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible
ITAM	Motivo activador basado en la tirosina
ITIM	Motivo inhibidor basado en la tirosina
kD	Kilodalton
KIR	Receptor del tipo inmunoglobulina de las células asesinas
KIR	Receptores citotóxicos tipo inmunoglobulina

KLR	Receptor de células citotóxicas tipo lectina
LDH	Lactato deshidrogenasa o deshidrogenasa del ácido láctico
LILR	Receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina
LILRB-1	Receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina subfamilia B1
LILRB-2	Receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina subfamilia B2
LIR	Receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina
LMP2	Proteosoma multifuncional grande 2
LMP7	Proteosoma multifuncional grande 7
LRC	Complejo de receptores leucocitarios
Lys	Lisina
LLT1	Transcrito-1 de la familia de las lectinas tipo C1
MAPK	Proteínas quinasas que se activan por mitógenos
MC1R	Receptor 1 de la melacortina
mDC	Células dendríticas monocitoides
MDM2	Proteína murino doble minuto 2
MED	Dosis mínima para producir eritema
MES	Melanoma de extensión superficial
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC	El complejo mayor de histocompatibilidad
MIS	Melanoma “ <i>in situ</i> ”
MITF	Factor de transcripción asociado a la microftalmia
MLA	Melanoma lentiginoso acral
MLM	Melanoma léntigo maligno
MM	Melanoma maligno
MN	Melanoma Nodular
MSH	Hormona estimuladora del melanocito

MSHR	Receptor de la hormona que estimula los melanocitos
MTS1	Supresor multi-tumor 1
NCAM	Molécula de adhesión de la célula neural
NCAM	Molécula de adhesión neural
NCR	Receptores citotóxicos naturales
NK	Célula asesina natural (del inglés, <i>Natural Killer</i>)
NKR	Receptores asociados a células citotóxicas naturales
NM	Nevi melanocíticos
NO	Oxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
<i>P</i>	Probabilidad
PBS	Solución tamponada de fosfato
PCB	Bifenilos policlorados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	Reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos
PCR-SSO	de secuencia
	Reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos de
PCR-SSP	secuencia
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína que contiene peridrina-clorofila
PILAR	receptor asociado a la proliferación inducida de los linfocitos
PKB	Proteína quinasa B
PTEN	Gen de la fosfatasa y homólogo de tensina
PVC	Cloruro de polivinilo
RE	Retículo endoplásmico

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SCF	Factor de células madre
SEM	Error estándar de la media
SLBN	Biopsia del ganglio linfático centinela
SLBN	Biopsia del ganglio linfático centinela
SLT	Tejido linfoide secundario
SND	Síndrome del nevus displásico
SSP	Cebadores (<i>primers</i>) específicos de secuencia
TAP	Transportadores asociados al procesamiento antigénico
TCR	Receptor clonotípico de la célula T
TEIPP	Epítomos para células T asociados con defectos en el procesamiento de péptidos
Th	Linfocitos T cooperadoras
Thr	Treonina
TIL	Linfocitos infiltrantes del tumor
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta A
UV-B	Ultravioleta B
UV-C	Ultravioleta C
WHO	Organización mundial de la salud

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. EMBRIOLOGÍA	3
3. ETIOLOGÍA	8
3.1. Luz solar	8
3.2. Factores químicos	10
3.3. Factores hormonales	11
3.4. Factores genéticos	11
4. EPIDEMIOLOGIA	17
4.1. Factores dependientes de las características del individuo	19
4.2. Factores ambientales	21
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS Y	
5. CLASIFICACION.	23
5.1. Lesiones precursoras del melanoma	23
5.1.1. Nevi congénitos	23
5.1.2. Nevi comunes adquiridos o benignos	26
5.1.3. Nevi atípicos...	27
5.1.4. Léntigo maligno (LM)	29
5.1.5. Tumor de Spitz	30
5.2. Tipos histológicos y clasificación del melanoma cutáneo	32
5.2.1. Melanoma de extensión superficial (MES)	37
5.2.2. Melanoma léntigo maligno (MLM)	38
5.2.3. Melanoma lentiginoso acral (MLA)	39

5.2.4. Melanoma nodular (MN)	40
5.3. Estadificación clínica del melanoma	41
6. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	46
6.1. Moléculas HLA de clase I	47
6.2. Moléculas HLA de clase II	60
7. HLA Y ENFERMEDAD	62
BIOLOGÍA DE LA CÉLULA DE MELANOMA E INTERACCIÓN	
8. CON EL HUÉSPED	65
9. RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA EL MELANOMA	66
9.1. Respuesta inmunitaria mediada por células NK	68
9.2. Respuesta inmunitaria mediada por células T	73
RECEPTORES NK (NKR) Y SUS CORRESPONDIENTES	
10. LIGANDOS	76
10.1. CD56	80
10.2. CD161	82
10.3. Receptores KIR	84
10.4. Ligandos de los Receptores KIR	87
10.5. Ligandos de los Receptores NK (NKR)	93
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	100
PACIENTES Y MÉTODOS	101
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	103
2. MÉTODO DIAGNÓSTICO DEL MELANOMA	103
2.1. Inspección clínica	103
2.2. Dermatoscopia	104
2.3. Biopsia de la lesión cutánea	104
3. PACIENTES Y CONTROLES	104
3.1. Criterios de selección de Pacientes	104

3.1.1.	Criterios de inclusión	105
3.1.2.	Criterios de exclusión:	105
3.2.	Variables demográficas, clínicas e histopatológicas	105
3.2.1.	Variables demográficas y clínicas	105
3.2.2.	Variables histológicas	106
3.3.	Variables experimentales	106
4.	PROTOCOLO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS	107
4.1.	Biopsia selectiva del ganglio centinela	107
4.2.	Extracción de ADN y Amplificación	109
4.2.1.	Protocolo de extracción de ADN	109
4.3.	Tipaje de HLA-A y HLA-B	110
4.3.1.	Técnicas serológicas de microlinfocitotoxicidad o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)	110
4.3.2.	PCR-SSP para genotipaje HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1	114
4.3.3.	Técnica de tipaje por PCR-SSP	115
4.4.	Genotipaje de HLA-C	116
4.4.1.	PCR-SSO reversa	117
4.5.	Genotipaje de HLA-E	121
4.6.	Citometría de flujo	121
4.7.	Anticuerpos monoclonales	122
4.7.1.	Procedimiento de marcado celular: Inmunofluorescencia directa	123
4.7.2.	Estandarización del citómetro de flujo	125
4.7.3.	Adquisición y análisis de muestras	125
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	127
	RESULTADOS	129
	SERIES ESTUDIADAS Y SUS CARACTERÍSTICAS	
1.	DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS	131
	FRECUENCIA DE ANTÍGENOS HLA A Y HLA B EN	
2.	PACIENTES CON MELANOMA	132
	ESTUDIO DE HLA A Y HLA B EN RELACIÓN AL	
3.	PRONÓSTICO DEL MELANOMA	138

PAPEL DE LOS ALELOS HLA C EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL	
4. MELANOMA	
5. HLA C Y SU PAPEL PRONÓSTICO EN EL MELANOMA	146
ANTÍGENOS HLA DE CLASE II (HLA DR Y -DQ) EN	
6. RELACION CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL MELANOMA	150
ESTUDIO DE LA RELACION DE HLA DR Y HLA DQ CON EL	
7. PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD	151
ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE HLA E EN PACIENTES	
8. CON MELANOMA	154
EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CD57, CD56, CD94 Y CD161, EN	
9. CÉLULAS T CD8+DE PACIENTES CON MELANOMA	156
ESTUDIO DE LOS RECEPTORES KIR2D (CD158a/h Y	
10. CD158b/j) EN LINFOCITOS T CD8+ Y CÉLULAS NK CD56+	161
NIVEL DE EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD158a/h Y	
11. CD158b/jEN LINFOCITOS T CD8+ Y CÉLULAS NK CD56+	164
ANÁLISIS DE LINFOCITOS T CD8+CD28- Y CÉLULAS NK	
CD56+ QUE EXPRESABAN CD158a/h O CD158b/j EN	
12. INDIVIDUOS CON DIFERENTES ALOTIPOS Y	166
DISCUSIÓN	171
BIBLIOGRAFÍA	195

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El melanoma es una neoplasia originada por la transformación maligna de los melanocitos (Figura 1), células derivadas de la cresta neural que están provistas de melanosomas y especializadas en la biosíntesis y transporte de melanina, el pigmento que da color a la piel, al pelo y a la úvea ocular.

La mayoría de los melanomas se localizan en la piel pero también pueden aparecer en otros lugares como mucosas, retina y leptomeninges; de hecho, el melanoma intraocular constituye el tumor ocular primario más común en la raza blanca siendo su frecuencia 8 veces mayor que en la raza negra y 3 veces mayor que en la asiática (Cardesa et al, 2012).

La primera comunicación acreditada de melanoma aparece en los escritos de Hipócrates (460 – 375 a C), quien lo describió como “tumores fatales negros con metástasis”. La siguiente reseña histórica se debe a Rufus de Éfeso (60 – 120 d C). Asimismo, los paleopatólogos han detectado esta enfermedad en momias incas precolombinas de aproximadamente la misma época. La primera publicación moderna de un paciente con esta enfermedad la hizo John Hunter en 1787; no obstante, la descripción de la enfermedad y su nombre se acuñó en 1806 cuando Laennec la describió como “melanosis” en la Facultad de Medicina de París. El término melanoma fue sugerido por vez primera por Robert Carswell en 1838. Pemberton, en 1858, fue partidario del tratamiento quirúrgico radical de este tipo de lesiones y en 1907 William Sampson Handley describió las vías anatómicas de diseminación y su extensión linfática centrífuga y recomendó la resección en bloque del melanoma a la vez que los márgenes de la lesión (Moyano, 2003).

2. EMBRIOLOGÍA

Los melanocitos, células productoras de melanina, y responsables de la pigmentación de la piel, derivan de las células pluripotenciales de la cresta neural, al igual que diversos tipos celulares como las neuronas, las células gliales y las células secretoras del sistema neuroendocrino periférico. Sus precursores, conocidos como melanoblastos, emigran desde la cresta neural durante el primer trimestre de la

gestación para poblar diversas regiones tisulares, como la piel, úvea, meninges y mucosa ectodérmica.

La diferenciación progresiva de los melanoblastos en la piel durante el desarrollo embrionario, fetal y neonatal, produce los melanocitos maduros de la epidermis del adulto, que son células dotadas de un citoplasma con marcadas prolongaciones o dendritas, y fuertemente pigmentadas.

La determinación de los melanoblastos a partir de los precursores de la cresta neural es un proceso progresivo que implica la restricción de las células pluripotenciales a la línea melanogénica, la adopción del perfil de expresión de genes de la línea melanocítica y la consiguiente transformación morfológica (Dupin et al., 2003). A pesar de su relevancia, aún no se conocen bien los mecanismos implicados en el desarrollo y diferenciación de los melanocitos, así como los factores que regulan su supervivencia y proliferación, incluyendo factores de transcripción, ligandos extracelulares, receptores transmembrana y moléculas de señalización intracelular, entre otros, que podrían ayudar a entender las diferentes patologías relacionadas con estas células.

La migración de los melanoblastos desde la cresta neural y su entrada en el estrato epidérmico y en los folículos pilosos, es un proceso que requiere la digestión proteolítica de la matriz extracelular para facilitar su penetración a través de los somitos y de otros tejidos. De esta forma, cuando las células de la cresta neural en proceso de diferenciación se orientan hacia el linaje melanocítico, activan un programa de expresión genética que les concede la capacidad de migrar. El comportamiento de migración está determinado por la expresión tanto de moléculas de señalización como de receptores en la superficie celular (Harris et al., 2007) y están gobernados básicamente por familias de factores de crecimiento y diferenciación como las moléculas de señalización wingless (Wnt) y las proteínas morfogénicas del hueso (BMP, del inglés, *bone morphogenetic proteins*), aunque otras rutas de señalización, como las activadas por el factor de células madre, SCF, del inglés, *stem cell factor*) y Endotelina 3, pueden también estimular la melanogénesis (Alvarez et al., 2010). Una vez en su destino, la diferenciación posterior debe incluir la desactivación del programa de expresión genética para la

migración. Se cree que su reactivación puede ser uno de los principales pasos que llevan a los melanocitos atípicos, que crecen autónomamente de forma localizada, a convertirse en células metastatizantes capaces de migrar e invadir. Por tanto, las investigaciones más recientes se han centrado en los aspectos moleculares de los mecanismos responsables de esta reactivación, que pueden ser el objetivo de nuevos métodos terapéuticos eficaces para combatir la enfermedad diseminada que se asocia a una supervivencia a largo plazo extremadamente baja.

Como muestra la Figura 1, en la piel, los melanocitos se sitúan en la capa basal de la epidermis (Chudnovsky et al., 2005, Prada et al., 2000) y, bajo el estímulo de dos hormonas, hormona estimuladora del melanocito (alfa MSH) y hormona adrenocorticotropa (ACTH), elaboran el pigmento melánico. Se considera que alfa MSH, además, puede desempeñar cierto papel en el mantenimiento de la diferenciación de estas células.

La síntesis de la melanina en los melanocitos tiene lugar en unos orgánulos denominados melanosomas. Estos orgánulos presentan una morfología elíptica, asociada a membrana y con un alto nivel de organización. Los melanosomas se transfieren a los queratinocitos por medio de las dendritas donde desempeñan su papel de fotoprotección (Fitzpatrick et al., 1979).

La melanogénesis comienza con la síntesis de los constituyentes de los melanosomas, como las enzimas y las proteínas estructurales entre otros. Más tarde se forman los melanosomas con la consiguiente melanización y posteriormente hay una transferencia de los melanosomas a los queratinocitos adyacentes. Los melanocitos junto con los queratinocitos forman lo que llamamos unidades pigmentarias. Por último, se produce la degradación de los melanosomas eliminándose la melanina. Tras la liberación de la melanina ésta se dispone envolviendo a los núcleos y, de esta manera, protege al ADN.

La melanina se acumula en el interior de los melanosomas y de su tamaño, número y disposición dentro de los melanocitos dependen los fototipos o diferencias interraciales, todo ello programado genéticamente. Sin embargo, la cantidad de melanina sintetizada, depende de los estrógenos (Thornton, 2002) y de otros factores

hormonales como la hormona activadora de la melanina (MSH) y sobre todo de la exposición al sol (Friedmann et al., 1990).

La producción de los dos tipos de melanina comienza con la oxidación de la tirosina por la tirosinasa convirtiéndose en 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y aunque esta reacción es lenta, puede verse acelerada por el efecto catalítico de la propia DOPA que se forma. En un segundo paso, la DOPA se deshidrogena para dar lugar a la dopaquinona. Este paso es algo más rápido y está también catalizado por la tirosinasa. En este punto de la ruta es donde se produce la bifurcación de la ruta para la síntesis de los dos tipos de melanina, la feomelanina y la eumelanina. Hay evidencias de la participación de un enzima más en la síntesis de eumelanina, la dopacromooxidasa (DCOR), que cataliza el paso de dopacromo a 5,6-dihidroxiindol (Barber et al., 1985).

Cada melanocito penetra con sus dendritas en las capas superiores del epitelio, transportando los melanosomas que contienen el pigmento melánico, existiendo un melanocito por cada 36 - 40 queratinocitos (unidad melánica epidérmica). La densidad de los melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica, por ejemplo son más abundantes en la región genital y la de la areola mamaria, pero es muy constante entre los individuos de diferentes razas (Planas, 2003). El número de melanocitos por unidad de superficie cutánea no muestra correlación significativa con la predisposición a desarrollar melanoma, esto lo demuestra el hecho que este tumor es mucho más frecuente en la raza blanca que en la negra.

Por otra parte, se ha comprobado mediante estudios en cultivos celulares que las células tumorales difieren de los melanocitos normales en que, aunque éstos precisan para proliferar el estímulo de ciertas sustancias presentes en el medio, como insulina o el factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina (IGF - 1, del inglés, *insulin - like growth factor - I*); las primeras crecen de forma continuada, aun sin adición de factores exógenos de crecimiento: Este crecimiento puede ser debido a mecanismos autoestimuladores que parecen incluir factores de crecimiento y citoquinas producidos por las propias células neoplásicas; de éstos factores, el más relevante es el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, del inglés, *basic*

fibroblast growth factor), un mitógeno presente en algunas células humanas normales, pero no en melanocitos.

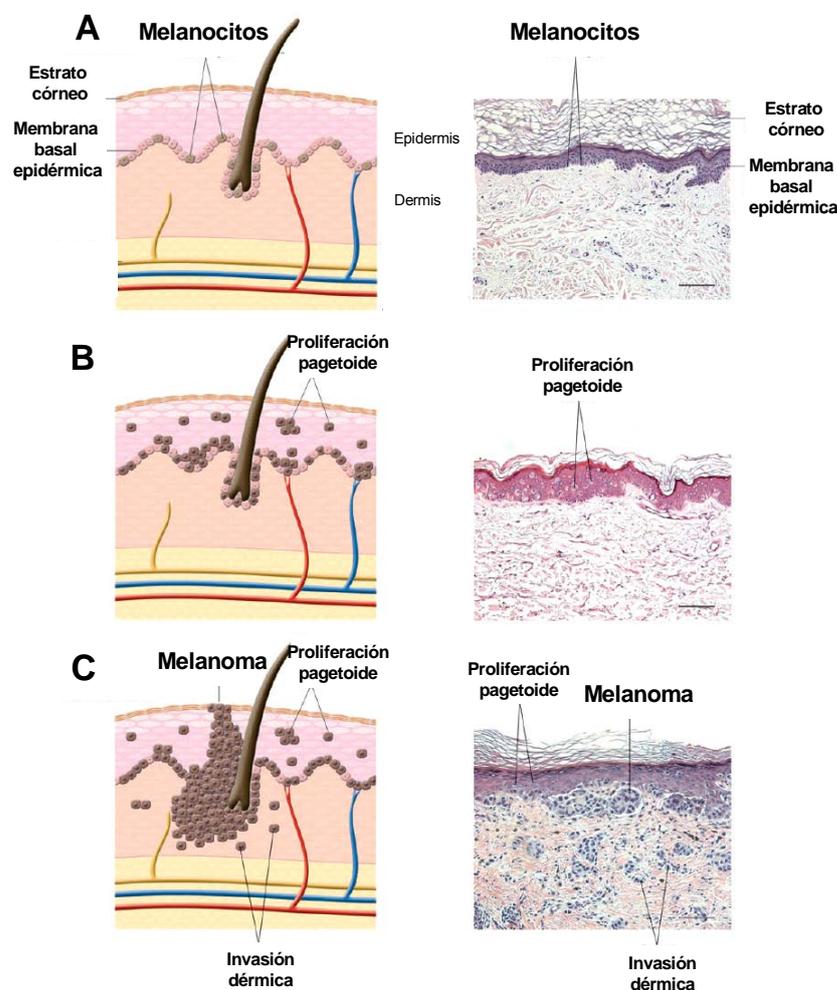


Figura 1. Fases de progresión histológica de la transformación de los melanocitos. Secciones histológicas teñidas con hematoxilina - eosina y sus correspondientes representaciones gráficas. (A) Piel normal. Distribución de los melanocitos normales en la membrana basal epidérmica. (B) Melanoma in situ. Las células de melanoma han migrado a la parte superior de la epidermis (proliferación pagetoide); las células no han penetrado la membrana basal epidérmica. (C) Melanoma en fase de crecimiento vertical. Las células de melanoma muestran proliferación pagetoide y han penetrado la unión dermoepidérmica con invasión dérmica. Chudnovski et al., J Clin Invest 2005;115:813 - 824.

3. ETIOLOGÍA

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología del melanoma, la etiopatogenia esta enfermedad no está suficientemente clara aunque, como en la mayoría de los cánceres, existe una predisposición genética cuyo efecto incide en la progresión o en la supresión del mismo (Bernal- Pérez M, 2005) y unos factores de riesgo ambientales que pueden favorecer el desarrollo del melanoma.

3.1. Luz solar

Dentro de los factores ambientales, la radiación solar UV es considerada como el factor etiopatogénico más importante en el desarrollo del melanoma maligno (MM) (World Health Organization, 1997; Maddodi N, 2008; Moan J, 2008; Garibyan et al. 2010). El sol es un emisor de radiaciones electromagnéticas de longitudes de onda muy diversas y, aparentemente, cuanto más corta es la longitud de onda, mas energética es la radiación y mayor su capacidad de producir reacciones químicas y biológicas. En el espectro electromagnético, las radiaciones UV se sitúan entre 100 y 400 nm de longitud de onda y, aunque el límite inferior es difícil de precisar, todas ellas se integran entre las radiaciones visibles de menor longitud de onda (luz violeta) y las llamadas radiaciones ionizantes. Las radiaciones UV, según sus efectos biológicos, han sido divididas en tres grupos: UV-A (longitudes de onda entre 400 y 320 nm), UV-B (entre 320 y 280 nm) y UV-C (menores de 280 nm) siendo, por tanto, más energéticas las UV-C que las UV-B y éstas más que las UV-A (Bernal-Pérez M, 2005).

Las radiaciones UV-A son capaces de producir pigmentación de la piel pero necesitan grandes dosis para producir un efecto biológico por lo que hasta hace pocos años eran consideradas inocuas. En condiciones experimentales las UV-B alteran el ADN celular y producen eritema en la piel humana y cáncer de piel en animales de experimentación. Las UV-C son absorbidas en alto grado por los ácidos nucleicos y son muy eficientes para matar organismos unicelulares (bacterias, virus, hongos) pero, en los humanos, las capas superficiales de la piel muerta absorben la radiación hasta tal punto que sólo se produce un eritema leve incluso después de exposiciones repetidas. Por otro lado, aunque el sol emite grandes cantidades de radiaciones

UV-A, UV-B y UV-C, solamente las UV-A y una pequeña parte de las UV-B alcanzan la superficie terrestre. Este hecho es debido a que la capa de ozono estratosférico tiene una fuerte banda de absorción de la radiación UV que decrece rápidamente con el aumento de la longitud de onda de la radiación por lo que casi ninguna radiación de longitud de onda menor de 288 - 290 nm (UV-C) alcanza la superficie de la Tierra. Como consecuencia, el tipo de radiación UV solar más importante desde el punto de vista de la salud de la población es la radiación UV-B y la UV-A (Vallejo - Delgado L, 2003). Casi todas las radiaciones UV-C y UV-B son absorbidas por la capa de ozono de la atmósfera terrestre pero con la progresiva desaparición de ésta, se prevé que en el futuro inmediato aumentará el flujo de radiaciones UV-B, sobre todo en las longitudes de onda más cortas.

No está claro qué longitudes de onda son las más activas en la patogenia del melanoma en la raza humana. No obstante, se sabe que las radiaciones UV actúan sobre la piel estimulando directamente la producción de tumores cutáneos, ya que suprimen el sistema inmunológico cutáneo y producen lesiones moleculares en los melanocitos (sobre todo en su ADN) estimulando su división y la producción de melanina.

Abundando en estos efectos, se ha observado que la incidencia de melanoma es mayor en latitudes más cercanas al ecuador y, por otra parte, este tumor suele aparecer con mayor frecuencia en zonas corporales expuestas. Es de destacar que la incidencia del melanoma es mayor en sujetos que toman el sol de forma intermitente e intensa, como personas jóvenes de ambientes urbanos o profesionales no expuestos al sol, a diferencia de otros tumores cutáneos que obedecen más al efecto acumulativo de la exposición solar prolongada y continua. A diferencia del melanoma cutáneo, la presentación ocular del melanoma, no parece estar relacionada con la exposición solar.

No obstante, el efecto de la luz solar está mediatizado por algunos elementos, a saber:

El *fenotipo cutáneo* que determina la propensión a la quemadura solar (Tabla 1), siendo los individuos más sensibles los de piel muy clara, ojos azules o verdes, pelo rubio o rojizo, pecosos y con fototipo cutáneo I de Fitzpatrick (siempre

se queman y nunca se broncean); de hecho, existe una relación inversa entre el grado de pigmentación y el daño actínico en la piel, incluyendo la fotocarcinogénesis (Fitzpatric, 1995; Riley, 2005). Una excepción son los sujetos albinos que se queman fácilmente y presentan un riesgo muy alto de cáncer cutáneo distinto al melanoma, sobre todo carcinoma de células escamosas pero, en ellos, el riesgo de melanoma parece ser menor.

Las *lesiones del ADN celular* están relacionadas con la aparición del cáncer de piel (Sandford KK et al., 1997; Landi et al., 2002). Por ejemplo, en los pacientes con xeroderma pigmentosum, cuyo defecto consiste en la alteración de los mecanismos de reparación del ADN, la exposición a la radiación UV les produce alteraciones celulares en la piel que se traducen en una altísima incidencia de tumores cutáneos (Kenneth HK et al., 1994; Wang et al., 2009) y, de hecho, el riesgo de presentar melanoma antes de los 20 años de edad es 2000 veces mayor que en la población general. Las lesiones del ADN celular pueden verse agravadas por el uso de sustancias químicas fotosensibilizantes (Epstein JH, 1978, Mancini AJ, 2004).

Las *mutaciones o alteraciones genómicas de los protooncogenes* hacen que se altere la secuencia normal de división y diferenciación celular y favorecen la producción de la proteína estimuladora del crecimiento o de su receptor, denominándose entonces oncogenes. Este fenómeno puede ser desencadenado por las radiaciones UV (Wang et al., 2009).

Por otra parte, la **apoptosis** es un mecanismo celular por el cual, de forma natural, las células seriamente dañadas se suicidan. En la piel la apoptosis elimina las células dañadas por los rayos UV evitando así que se vuelvan cancerosas; esto se manifiesta, por ejemplo, en las lesiones descamativas que se producen después de las quemaduras solares. En algunos casos, *mutaciones genéticas en los factores que median la apoptosis* hacen que las células se vuelvan inmortales y sigan proliferando dando como resultado el cáncer de piel (Pedeux et al., 2006).

3.2. Factores químicos

Se ha observado cierta asociación del melanoma con la exposición, en el ámbito laboral, a ciertos productos químicos (Langard et al., 2000); entre ellos, los

bifenilos policlorados (PCB) y el cloruro de polivinilo (PVC). También se ha asociado, en el terreno farmacológico, con beta - bloqueantes y fármacos como la levodopa (Yamada et al., 1990; Kannengiesser et al., 2007), ciertas hormonas y algunas drogas (Young et al., 2001; Althuis et al., 2005).

3.3. Factores hormonales

Su papel es poco claro y aunque la tasa de incidencia similar en ambos sexos, las mujeres tienen un pronóstico global mejor que los hombres, ventaja que desaparece tras la menopausia.

Algunos estudios asocian una mayor incidencia de melanoma a la ingesta de anticonceptivos orales, sobre todo si ésta tiene lugar durante un período superior a 5 años; sin embargo, esta influencia no está confirmada (Young et al., 2001; Althuis et al., 2005). La influencia del embarazo es muy discutida, con resultados contradictorios.

Tabla 1. Clasificación de tipos de piel (adaptada de Fitzpatrick y Bologna)

Fototipo cutáneo	Se quema tras la exposición al sol	Se broncea tras la exposición al sol
I. Deficiente en melanina	Siempre	Raramente
II.	Habitualmente	Algunas veces
III. Con melanina suficiente	Algunas veces	Habitualmente
IV.	Raramente	Siempre
V. Con protección melanica	Piel morena natural	
VI.	Piel negra natural	

1 Fitzpatrick TB, et al, publicada en TB Fitzpatrick and JL Bologna, Human melanin pigmentation: Role in pathogenesis of cutaneous melanoma. En: Zeis L, Chedekel MR, Fitzpatrick TB (eds.) Melanin: Its role in human photoprotection. Overland Park, KS, Valdenmar Publishing Company, 1995:177-82.

3.4. Factores genéticos

En 1820, Norris describió por primera vez la variante hereditaria del melanoma que ha sido confirmado en numerosos estudios posteriores. El 0,4 - 12,3% de los pacientes, tienen historia familiar positiva; de hecho, familiares de pacientes con melanoma con consanguinidad de primer grado tienen una probabilidad 1,7 veces mayor de desarrollar melanoma que la población general y de que aparezca la neoplasia a edades más precoces. En los pacientes afectos de melanoma familiar, la incidencia de aparición de melanomas primarios múltiples es del 12,3%, frente a un

2,8% en la población general. La asociación con otros tumores en el ámbito familiar no es significativa, pero sí con genodermatosis como xeroderma pigmentosum.

Existe un tipo de lesiones que se consideran precursoras del melanoma, éstas son los nevi melanocíticos (NM) atípicos que, para muchos autores, son lesiones intermedias tanto clínica como histológicamente entre los NM y la fase de crecimiento radial de un MM. Por otra parte, existen dos tipos de NM atípicos, los esporádicos y los que aparecen en el contexto del “Síndrome del nevus displásico familiar” más conocido como “Síndrome del nevus atípico”. Las características clínicas del NM atípico vienen definidas por una morfología asimétrica, variedad de color con áreas marrón claro y oscuro e incluso áreas despigmentadas, bordes irregulares y angulosos, y un tamaño diámetro > 6 mm, aunque pueden ser mayores. A su vez, pueden ser únicos o múltiples, esporádicos y familiares, y se localizan fundamentalmente en el tronco y en los brazos, aunque pueden aparecer en cualquier otra localización. En el Síndrome del nevus displásico familiar aproximadamente el 50% de los miembros están afectados, por lo que se considera que tienen una transmisión autosómica dominante, de penetrancia y expresividad variable. Los NM atípicos suelen desarrollarse durante la infancia, su número ronda las cien lesiones y se distribuyen fundamentalmente por el tronco. El riesgo de desarrollar un melanoma a lo largo de la vida en los pacientes afectos se acerca al 100%, con una probabilidad de hacerlo del 56% entre los 20 y los 59 años. Sin embargo, los pacientes de las mismas familias no afectados no tienen un aumento de riesgo de desarrollar melanoma. Por otra parte, los pacientes con este síndrome que ya presentaron un melanoma tienen mayor riesgo de desarrollar un segundo melanoma primario.

En la actualidad, se están investigando varios factores genéticos por su posible papel en el desarrollo del melanoma, incluyendo tanto genes heredados como defectos genéticos que son adquiridos por las agresiones ambientales (Palmieri et al., 2009). Algunos de estos defectos afectan a algunas vías celulares de gran importancia en la evolución del tumor como son la proliferación, la senescencia y la apoptosis celular. Se estima que esta predisposición genética es debida a la transmisión autosómica dominante con penetrancia incompleta de un gen de susceptibilidad (Figura 2).

De hecho, se han observado numerosas alteraciones genéticas (mutaciones, amplificaciones, traslocaciones y deleciones de regiones cromosómicas) y alteraciones epigenéticas (cambios heredados que afectan a la secuencia de ADN, generalmente por modulación transcripcional por metilación del ADN y/o por alteraciones de la cromatina como en la modificación de las histonas) que se han revelado posibles candidatos de activación de oncogenes y genes supresores de tumores algunos de los cuales se describen a continuación:

Hasta la fecha, el gen mejor caracterizado es el de la **quinasa inhibidora dependiente de ciclina 2A** (*CDKN2A*, del inglés, *cyclin - dependent kinase inhibitor 2A*) también llamado **supresor multi-tumor** (MTS1, del inglés, *Multi tumor - suppressor*), que se localiza en el cromosoma 9p21, presenta alta penetrancia y está involucrado en la patogénesis y en la progresión del melanoma; de hecho, las mutaciones del *CDKN2A* pueden explicar del 20% al 50% de los casos heredados (Goldstein et al., 2005; Laud et al., 2006). Este gen codifica dos proteínas por marco de lectura alternativo, ARF (ARF, del inglés, *alternative reading frames*) que son fundamentales en la regulación del ciclo celular y la transición de la fase G1-S, p16INK4A y p14ARF. La proteína P16 actúa como reguladora en la vía del retinoblastoma al unirse e inhibir competitivamente las quinasa dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6 por lo que también se la conoce como inhibidor de la quinasa 4A (INK4a, del inglés, *inhibitor of cyclin - dependent kinasa 4A*). La CDK4 se une con la ciclina D1, complejo necesario para la transición de la fase G1 a S del ciclo celular mediante la fosforilación e inactivación del producto del gen del retinoblastoma, lo cual permite la liberación del factor de transcripción E2F y, así, la progresión a la fase S del ciclo celular con la posterior división y proliferación celulares. Una alteración en P16 permitiría la progresión no controlada del ciclo celular y la proliferación de células con daño del ADN. La proteína p14ARF se une a la proteína murino doble minuto 2 (MDM2, del inglés, *murine doble minute 2*) y regula el crecimiento de los melanocitos, inhibiendo la destrucción de p53 por la vía de la ubiquitina lo cual produce un aumento en la supervivencia de las células alteradas (Figura 2).

Variantes germinales del **gen que codifica el receptor 1 de la melancortina** (*MC1R*, del inglés, *melanocortin receptor 1*), también conocido como el receptor de la hormona que estimula los melanocitos (MSHR, del inglés, *melanocyte - stimulating hormone receptor*), que pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G, normalmente envían señales aguas abajo en la cascada de la vía BRAF regulando el nivel intracelular de la adenosinmonofostato (AMPc). El gen *MC1R* es altamente polimórfico en la población caucasoide (Box et al., 1997) y se localiza en el cromosoma 16q24.3 y, entre otros efectos, controla el balance entre la producción de eumelanina (negra/marrón) y feomelanina (roja/amarilla) en respuesta a la radiación UV. La prevalencia de *MC1R* es difícil de estimar ya que varía según la población y se deben diferenciar las variantes polimórficas de este gen verdaderamente relacionadas con el desarrollo del melanoma; de hecho, el 60 - 80% de las variantes de *MC1R* que se han asociado con el fenotipo pelirrojo implican una afinidad menor de este receptor por la melanotropina u hormona estimulante de los melanocitos (MSH, del inglés, *melanocyte - stimulating hormone*). Curiosamente, se han descrito variantes de *MC1R* asociadas al desarrollo de melanoma en sujetos de fototipo oscuro de raza caucásica, por lo que se ha concluido que ciertos polimorfismos del gen *MC1R*, v.g. Arg151Cys, Arg160Trp y Asp294His28, confieren un riesgo de susceptibilidad para el melanoma parcialmente independiente de su efecto en el color del pelo o la incapacidad para broncearse.

BRAF y **RAF** son dos importantes moléculas que pertenecen a la vía de transducción de señal de las proteínas quinasas que se activan por mitógenos (MAPK, del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) y que regula el crecimiento, la supervivencia y la invasión celular. Las mutaciones en BRAF aparecen en el 15% de las neoplasias del ser humano, en el 60% de los melanomas y, particularmente, en el 80% de los melanomas asociados con la exposición intermitente al sol, sin embargo, estas mutaciones son raras en melanomas de pieles con exposición crónica al sol o regiones anatómicas poco o nada expuestas al sol (Maldonado et al., 2003). Por otra parte, en un estudio reciente realizado en dos poblaciones caucasoides independientes, se ha demostrado que las variantes de *MC1R* están fuertemente asociadas con las mutaciones en BRAF en los melanomas no asociados a exposición crónica al sol, lo que lleva a la hipótesis de que las mutaciones *BRAF* pueden ser

celular, la apoptosis, la migración celular y la propagación celular; impidiendo, de ese modo, la división rápida y el crecimiento incontrolado de las células tumorales por la vía del Proto-oncogén 1 de timoma viral, AKT (del inglés, *thymoma viral oncogene homolog*). PTEN desfosforila la fosfatasa fosfatidil inositol tri-fosfato (PIP3) que es necesaria para impedir que las células sufran apoptosis mediante la activación del factor de supervivencia proteína quinasa B (PKB, del inglés, *protein kinase B*)/AKT (PKB/AKT). Se ha demostrado que existe una pérdida de la expresión de PTEN en líneas celulares de melanoma con alta expresión de AKT que, contrariamente a la anterior, su acción estimula la progresión del ciclo celular, la supervivencia y la migración celular. De hecho, actualmente se considera que la AKT tiene un papel relevante en la tumorigénesis (Altomare et al., 2005).

Otro elemento importante que se ha asociado con el desarrollo del melanoma es el **Factor de transcripción asociado a la microftalmia** (MITF, del inglés, *microphthalmia - associated transcription factor*) que mapea en el cromosoma 3p14.1 - p12.3 y al que se considera como el “principal regulador de los melanocitos” y parece ser crucial en la supervivencia y el comisionamiento de la línea del melanoma. De hecho, se han encontrado bajos niveles de la proteína MITF en el melanoma invasivo además de asociarse con progresión de la enfermedad y mal pronóstico.

Unos nuevos candidatos relacionados con el desarrollo del melanoma son los **receptores Notch**, de hecho, hay evidencias recientes que sugieren que Notch1 aumenta la fase de crecimiento vertical por activación las vías de la MAPK y AKT.

Otro factor involucrado en la melanogénesis es el **óxido nítrico** (NO). Recientemente se ha descrito que la expresión de enzima sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS, del inglés, *Inducible nitric oxide synthase*) por células de melanoma se correlaciona con una pobre supervivencia de estos pacientes, posiblemente por sus efectos sobre la inflamación y vasodilatación que influyen en el microambiente tumoral favoreciendo la motilidad e invasividad del tumor. Se ha descrito en melanoma en estadio III, o sea, con metástasis en los nódulos linfáticos que la expresión de iNOS es inversamente proporcional a la expresión del ligando de la quimiocina 10, CXCL10, molécula con actividad antitumoral por suprimir los

fenómenos inflamatorios que en melanoma induce NO producido por iNOS (Tanese et al., 2012).

4. EPIDEMIOLOGIA

El melanoma supone el 3 - 4% de las neoplasias cutáneas pero es el responsable de la gran mayoría de las muertes debidas a estos tumores (Schäfer et al., 2006), originando aproximadamente el 65% de todas las muertes producidas por cánceres cutáneos y en un contexto más general, a él se le atribuyen el 1% de las muertes por cáncer de cualquier etiología (Bernal, 2005; Land et al., 1983).

La incidencia de esta neoplasia ha ido creciendo de manera exponencial en la población mundial. Así, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha estimado que en 2008 se diagnosticaron en el mundo 199.627 nuevos casos de melanoma cutáneo, de los cuales 3.602 ocurrieron en España, lo que representa una tasa anual ajustada por edad de 2,8 y 5,2 por cien mil habitantes, respectivamente. Globalmente, el melanoma cutáneo no es un tumor muy frecuente, representa el 1,6% del total de los cánceres que se diagnostican en el mundo, con diferencias muy notables entre países de alta y baja renta. El 80% de casos ocurren en América del Norte, Australia, Nueva Zelanda y Europa, siendo en algunos países como Australia y Nueva Zelanda el segundo cáncer con mayor incidencia. En España, solo en las mujeres aparece entre los diez cánceres más frecuentes.

En Europa la incidencia suele ser más alta en las mujeres a diferencia de Estados Unidos y Australia en donde los hombres presentan mayores tasas de incidencia. En España, también es más frecuente en las mujeres, 5,6 frente a 4,8 por cien mil en hombres (Martinez - Escribano et al, 2012). Un reciente estudio realizado en la población de Cataluña muestra que este cáncer es el que ha experimentado mayor incremento en los últimos veinte años, particularmente en mujeres.

Actualmente, el melanoma es uno de los tumores malignos con mayor supervivencia. Según el estudio EUROCARE- 4, que ha analizado los datos de 83 registros de cáncer de población de 22 países europeos, la supervivencia relativa de

los pacientes con MM a los cinco años del diagnóstico es del 81,6%, con poca variabilidad entre países (Martínez-Escribano et al., 2012).

En la Región de Murcia se diagnosticaron 1402 nuevos casos de melanoma cutáneo entre 1983 y 2003, de los cuales el 58% ocurrieron en mujeres y menos del 1% en menores de 15 años. Los melanomas de la piel representaron el 92,6% de todos los melanomas registrados, el 4% fueron oculares y el resto de mucosas. La tasa de incidencia de melanoma cutáneo en el último cuatrienio fue de 10,5 y 7,9 por cada 100.000 mujeres y hombres, respectivamente. Comparando las tasas ajustadas por edad a la población europea estándar, el riesgo de padecer un melanoma es un 21% mayor en las mujeres que en los hombres de la Región de Murcia. De hecho, la incidencia en Murcia se encuentra entre las más elevadas de las registradas en España, ocupando la segunda posición en hombres y la tercera en las mujeres, aunque muy alejada de las tasas más altas europeas o mundiales (Martínez-Escribano et al., 2012 et al., 2012). Igualmente, en esta Región, la supervivencia observada a los 5 años del diagnóstico de melanoma en el periodo 2000 - 2003 fue de 76,5%, correspondiendo un 81,5% a mujeres y un 70,6% a varones. La mayor supervivencia de las mujeres se ha observado en Europa y en España en todos los grupos de edad (Martínez-Escribano et al., 2012).

El melanoma es un típicamente tumor de adultos pero suele aparecer en edades más tempranas que la mayoría de los otros tipos de cáncer. El 50% de los melanomas aparecen en personas menores de 55 años y un 35% en personas de menos de 35 años; no obstante, los adolescentes también pueden desarrollar melanoma y existe un pico diagnóstico en la cuarta década de la vida. La mayoría de los melanomas primarios de piel se originan de *novo* y aproximadamente el 25% se desarrolla sobre un nevus preexistente. Los pacientes de raza negra tienen una incidencia 10 veces menor que los de raza blanca.

Son muchos los factores implicados en la génesis del melanoma pero los más relevantes son los factores dependientes de las características de cada individuo y los factores ambientales.

4.1. Factores dependientes de las características del individuo

Lesiones precursoras: Se ha acuñado el término “síndrome del nevus displásico” (SND), ahora más conocido como “síndrome del nevus atípico”, para describir un conjunto de lesiones clínicas e histológicas que se heredan de forma autosómica dominante. Los pacientes afectados presentan múltiples nevi que comienzan a aparecer en la adolescencia, aunque pasados los 35 años siguen apareciendo nuevas lesiones. Este síndrome se asocia tanto a melanoma familiar como al esporádico, aunque, si el paciente tiene antecedentes familiares, el riesgo de desarrollar la enfermedad es prácticamente del 100%. Por tanto, en estos casos es obligatorio realizar revisiones periódicas cada 6 meses, y extirpar toda lesión sospechosa. También existe asociación con nevus congénito gigante (mayor de 20 cm de diámetro), cuyo riesgo de desarrollar melanoma oscila entre el 5% y 20%.

Fenotipo cutáneo: Consiste en los rasgos pigmentarios de cada individuo de los cuales dependen las reacciones de la piel a la luz solar e incluye color de piel, color de los ojos, color del pelo, tendencia a las pecas, y fototipo cutáneo. Representa, en general, el grado de sensibilidad actínica y es un factor independiente del número de nevi, respecto a la predicción del riesgo. Por otra parte, como se comentó anteriormente, la densidad melanocítica no parece mostrar correlación significativa con la predisposición a desarrollar melanoma; de hecho, a pesar de ser muy constante entre los individuos de las diferentes razas, el melanoma es más frecuente en la raza blanca que en la población negra u oriental y la incidencia del melanoma sigue aumentando considerablemente en la población blanca de todos los continentes mientras que aumenta muy poco en las poblaciones de origen africano o asiático (Riley, 2003).

Historia personal y familiar: El 5 - 10% de melanomas aparecen en sujetos con historia familiar de cáncer cutáneo, que sirve como indicador de susceptibilidad genética. En el 50% de familias con historia previa, es posible identificar el gen *CDKN2* o *p16INK4a*. Entre los pacientes con forma esporádica (no familiar), un 1,5 - 8,2% de los casos desarrollan un segundo melanoma primario. Esto sucede en todos los grupos de edad, y el riesgo se mantiene en el tiempo desde el primer diagnóstico.

Parece ser un hecho más frecuente en hombres y la incidencia es mayor en sujetos que presentan cánceres cutáneos de distinta estirpe, como carcinomas basocelulares o de células escamosas, pero ello parece ser sólo consecuencia de la exposición a la radiación solar y por eso son más susceptibles a todo tipo de tumores cutáneos.

Hormonas endógenas: No existe una correlación definida entre cambios hormonales e incidencia de melanoma, sin embargo, es cierto que la producción de melanina puede estimularse por acción de estrógenos, como ocurre durante el embarazo. Debe señalarse que la gestación no influye en la aparición de la enfermedad ni en su pronóstico y sólo es destacable el hecho que, si la embarazada está afecta, pueden aparecer metástasis transplacentarias que se alojan normalmente en la placenta, pero también alguna vez en el feto; por tanto, se recomienda esperar un plazo de 2 años tras la extirpación de un melanoma primario antes de iniciar un embarazo, por ser éste el período en que es más probable la recidiva. La ingesta de anticonceptivos orales no se relaciona con el riesgo o pronóstico del melanoma y lo mismo ocurre con el tratamiento hormonal sustitutivo durante la menopausia.

Edad: Con el envejecimiento, la capa externa de la piel (epidermis) se adelgaza, aun cuando la cantidad de capas celulares permanecen sin cambio alguno y la cantidad de células que contienen pigmento (melanocitos) disminuye. Además, con el envejecimiento disminuyen las células de Langerhans con la consiguiente pérdida de capacidad inmunocompetente de la piel.

Sexo: El factor sexo no parecen tener relación con una mayor incidencia en el desarrollo de los melanomas ya que según los datos recopilados en multitud de países la proporción en la distribución de este tumor por sexo es aproximadamente de un 50% salvo en ciertas variaciones locales donde se suele observar una mayor incidencia en un sexo u otro sin conocerse realmente el motivo. Lo que sí está claro es que el sexo influye claramente en la supervivencia y casi todas las estadísticas demuestran una mayor supervivencia de las mujeres y esta diferencia se hace más ostensible según avanza la edad. Un estudio comparativo australiano de 1998 sobre mortalidad según sexo indicaba que las tasas de mortalidad para mujeres y hombres en un rango de edad de 36 – 39 años era de 1,6 y 1,8 por 100.000 habitantes, respectivamente; pero esta diferencia se acentuaba en los pacientes entre 70 - 74 años

donde la mortalidad de las mujeres por 100.000 habitantes era de 12,4 frente a la de los hombres que era de 38,1 (Martinez - Escribano et al., 2012).

En la UE, de 60.000 casos diagnosticados en 2006, 33.000 fueron mujeres y 27.000 hombres. Sin embargo, el melanoma fue la causa de muerte de 7.200 hombres y 6.000 mujeres. En España, los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística de 2005, constaron que 841 personas murieron por esa causa, de ellos 479 fueron hombres y 362 mujeres, esto que supuso un 30 por ciento más que en 1996 en el que se constaron 641 fallecimientos.

Estatus socioeconómico: En un estudio realizado en pacientes diagnosticados de melanoma entre 1993 - 2003 se observó una mayor tendencia a desarrollar este tipo de tumor en individuos de mayor estatus socioeconómico. No obstante, una vez establecido el diagnóstico, los individuos con alto nivel económico presentaban un mayor supervivencia con una probabilidad menor del 37% de morir por la enfermedad después de descartar edad, género, estadio del tumor y otros factores; este hecho probablemente sea dependiente de un diagnóstico temprano y un tratamiento más precoz y adecuado (Zell et al., 2008).

4.2. Factores ambientales

Radiación solar ultravioleta: La radiación solar UV, sobre todo UV-B es el factor más importante siendo responsable de al menos un 65% de melanomas en todo el mundo, sobre todo en la población caucásica (Chang et al., 2010). La exposición de los individuos varía según algunos parámetros:

Latitud: En latitudes más cercanas al ecuador, la exposición es más intensa. Esto se compensa porque la población autóctona de esas zonas suelen tener un fenotipo cutáneo más oscuro. Sin embargo existen excepciones, como en Australia, a consecuencia de las migraciones (Hu et al., 2004).

Patrón de exposición solar: La exposición solar más peligrosa es la intensa y recreativa, frente a la continuada (ocupacional). Este fenómeno se ha agravado en los últimos tiempos debido a la disminución de la capa de ozono (Hu et al., 2004).

Exposición solar en la infancia: Algunos datos sugieren que la incidencia se relaciona con la frecuencia o severidad de quemaduras ampollosas en los 15 - 30 primeros años de vida, de forma que las personas que han sufrido exposición desde su infancia tienen más riesgo que las que han vivido previamente en zonas menos soleadas y después han emigrado (Hu et al., 2004).

Uso de protectores solares: Los protectores solares actúan absorbiendo y/o dispersando la radiación UV y, algunos, actúan biológicamente disminuyendo la formación de radicales libres. El uso de filtros físicos es imprescindible en condiciones ambientales extremas de radiación solar, como ocurre en la playa o en la nieve. La eficacia de los fotoprotectores frente a la radiación UV se mide con el factor de protección solar (FPS), que equivale al cociente entre la dosis mínima de UV requerida para producir eritema (MED, del inglés, *minimal erythema dose*) en la piel protegida con el fotoprotector (tras la aplicación de 2mg/cm² de dicho fotoprotector) con respecto a la MED en la piel no protegida (Martínez-Escribano et al., 2012).

Radiación ultravioleta no solar: Las lámparas de rayos UV-A, que aparecieron a finales de los años 70, según se ha comprobado, aumentan el riesgo de melanoma de forma independiente a la exposición solar y a los factores individuales. Este riesgo se duplica en sujetos que utilizan estas lámparas 10 o más veces al año. Antes de 1980, las lámparas emitían también UV-B y UV-C por lo que eran aún más peligrosas. De hecho, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha confirmado la asociación entre el cáncer de piel y la exposición a la radiación solar y el uso de los rayos UV que emiten los aparatos de bronceado. Un interesante estudio realizado en Islandia ha demostrado que las campañas disuasorias acerca del uso de camas solares ha reducido la incidencia de melanoma entre las mujeres. Todas estas evidencias han animado a muchos países a regular el uso de camas solares con objeto de evitar la exposición UV antes de la edad de 18 años (Gandini et al., 2011; Doré et al., 2012).

Otras exposiciones: Aunque sin confirmar, se ha intentado relacionar el melanoma con el empleo de algunos fármacos como el clomifeno y la gonadotropina coriónica humana (HCG), empleados en el tratamiento de la esterilidad (Young et al.,

2001). Parece existir también una relación significativa con beta-bloqueantes y, asimismo, se ha detectado mayor riesgo con tiazidas y benzodiazepinas, pero de forma no significativa.

5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS Y CLASIFICACION

Aproximadamente el 75% de los melanomas primarios de la piel se originan de *novo* y sólo alrededor de un 25% de ellos se desarrollan sobre nevus melanocíticos preexistentes. La lesión inicial consiste en una mácula, asimétrica, de coloración irregular, con bordes dentados y mayor de 6 mm de diámetro. Estas cuatro características clínicas es lo que se ha denominado el ABCDE del melanoma: A, asimetría, B, borde irregular; C, color abigarrado; D, diámetro mayor de 6 mm y E, Evolución o variación o cambio del aspecto de la lesión en el tiempo (Tabla 2). Estas características no son exclusivas del melanoma y pueden observarse también en lesiones melanocíticas benignas.

5.1. Lesiones precursoras del melanoma

5.1.1. Nevi congénitos

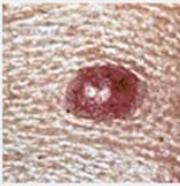
Son acúmulos de melanocitos névicos benignos que pueden situarse en la epidermis, dermis o en ambas y que, por definición, están presentes en el momento del nacimiento o aparecen durante el primer año de vida y existen en cerca del 1% de los recién nacidos.

La etiología de los nevi melanocíticos congénitos no está clara, aunque se cree que los melanocitos de la piel se originan en el neuroectodermo pero el tipo específico de célula de la que derivan siendo desconocido. Una hipótesis plausible, es que las células precursoras pluripotenciales de la vaina del nervio migran desde la cresta neural a la piel a lo largo de los ganglios paraespinales y las vainas de los nervios periféricos y se diferencian en melanocitos al llegar a la piel. Una posible explicación para la presencia de los nevus melanocíticos congénitos puede ser la existencia de una agresión externa capaz de inducir una mutación que afecta a la

morfogénesis del neuroectodermo embrionario y a la migración de las células precursoras hacia la piel (Tannous et al., 2005).

Los nevi aumentan de tamaño según crece el individuo alcanzando tamaños de más de 1 cm de diámetro en los adultos. Según el tamaño se clasifican 3 grupos: pequeños (menores de 1,5 cm de diámetro), medianos (de 1,5 a 20 cm) y gigantes (de diámetro mayor de 20 cm). Estas lesiones pueden ser claras u oscuras, con márgenes más o menos definidas y planas o papulosas, pudiendo contener pelo. Además, su contorno y color suelen ser uniformes y son asintomáticos. Los nevi congénitos gigantes suelen estar rodeados por varios nevus satélites más pequeños y pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo pero son más frecuentes en la espalda (Zayour et al, 2011).

Tabla 2. ABCD del melanoma: Características clínicas

Lunar Normal	El Melanoma	Señal	Característica
		Asimetría	una mitad del lunar no coincide con la otra
		Borden	el borde (contorno) del lunar es desigual o irregular
		Color	el color del lunar no es uniforme
		Diámetro	el diámetro del lunar es mayor que un borrador de lápiz

Fotografías usadas con el permiso del Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute)

Histológicamente, los nevi congénitos contienen las mismas células névicas que los nevi comunes adquiridos. Sin embargo los primeros presentan infiltración de células névicas en la parte inferior de la dermis reticular manteniéndose éstas estrechamente asociadas a las estructuras subyacentes como vasos sanguíneos, nervios, glándulas sudoríparas y folículos pilosos (Zayour et al, 2011).

Se calcula que el 1 - 2% de melanomas surgen sobre lesiones pigmentadas congénitas.

El riesgo de melanoma a lo largo de la vida en pacientes con nevi congénitos gigantes se cifra entre un 5% y 40%, aumentando significativamente en los pacientes con nevi congénitos que cubren más del 5% de su superficie corporal. Por tanto, es recomendable extirpar los nevi congénitos grandes a partir de los 6 meses de vida y los nevi pequeños pueden extirparse con anestesia local después de los 10 años.

Los nevi congénitos también pueden ser vistos como un componente de melanosis neurocutánea, un síndrome congénito raro descrito por primera vez en 1861 por Rokitansky y que se caracteriza por la presencia de nevi melanocíticos congénitos junto con una excesiva proliferación de células melánicas benignas o malignas en leptomeninges.

Los criterios actuales de diagnóstico para la detección de melanosis neurocutánea derivan de los propuestos por Kadonaga y Frieden en 1991 y son:

- Presencia de nevi congénitos grandes (20 cm de diámetro o más en el adulto o su tamaño proporcional de 9 cm en la cabeza o 6 cm en el resto del cuerpo del neonato y lactante) y múltiples (si existen al menos 3 lesiones), asociados a melanosis o melanomas meníngeos.
- Ausencia de melanoma cutáneo, salvo si las lesiones meníngeas son histológicamente benignas.
- No evidencia de melanoma meníngeo, excepto en los casos en que las lesiones cutáneas sean histológicamente benignas.

Aunque su patogenia se desconoce se piensa que su origen pueda ser el resultado de una aberración congénita en el desarrollo del neuroectodermo, que

determina la infiltración y proliferación de nevus melanocitos en el sistema nervioso central (Cramer, 1988). La mayoría de los casos son esporádicos, aunque se ha sugerido un patrón de herencia autosómico dominante con expresividad variable.

Clínicamente, los pacientes pueden presentar hipertensión intracraneal, debido a la hidrocefalia o una lesión en masa. El pronóstico de los pacientes con melanosis neurocutánea sintomática es muy pobre, incluso en ausencia de malignidad. En una revisión realizada en 1991 sobre 39 casos de melanosis neurocutánea sintomática, la muerte se produjo en más de la mitad de los pacientes a los 3 años de la aparición de síntomas neurológicos, y la mayoría de las muertes se produjeron en pacientes menores de 10 años (Kadonaga et al., 1991).

5.1.2. Nevi comunes adquiridos o benignos

Son conjuntos de melanocitos proliferantes aparentemente normales que suelen aparecer a partir del primer año de vida y generalmente antes de los 35 años de edad. Son lesiones bien circunscritas de superficie homogénea, pigmentación uniforme, contorno redondo u ovalado y pueden ser papilomatosos, en cúpula, pediculados o planos. La coloración puede ser rosada, del color de la piel, parda o negra y su tamaño suele ser menor de 1 cm de diámetro, aunque son asintomáticos. Se clasifican en tres tipos: **nevi de conjunción**, **nevi compuestos** y **nevi dérmicos**.

Los **nevi de conjunción** son los más corrientes en todos los sujetos y tienden a aparecer en zonas expuestas a la luz. Se trata de lesiones planas, ocre o marrones, de contorno circular y color uniforme que conservan los pliegues normales de la piel. La mayoría tienen menos de 5 mm de diámetro y muy pocos sobrepasan los 9mm. Se componen de melanocitos en la capa basal de la epidermis que se extienden focalmente hacia dentro de la dermis papilar.

Los **nevi compuestos** comienzan como lesiones marrón oscuro ligeramente sobreelevadas, de contorno uniforme, constituyendo lentamente un nódulo y suelen ser menores de 1 cm de diámetro. Los melanocitos se sitúan en la epidermis y en dermis y algunos de ellos tienen células gigantes multinucleadas.

Los **nevi dérmicos** son lesiones en cúpula, normalmente desprovistas de pigmento (acrómicas) y solamente tienen un componente dérmico.

El riesgo de melanoma asociado a los nevi comunes adquiridos es inversamente proporcional al grado de pigmentación cutánea y directamente proporcional al número de nevi, de hecho, los individuos con más de 50 nevi comunes adquiridos tienen un riesgo relativo 5 - 17 veces mayor de desarrollar un melanoma.

5.1.3. Nevi atípicos

Son lesiones melanocíticas cuyo definición actual es controvertida ya que para algunos autores representan variantes comunes de los nevi melanocíticos benignos mientras que para otros son lesiones intermedias tanto clínica como histológicamente situados entre los nevi melanocíticos y la fase de crecimiento radial de un MM (Kmetz et al, 2009). Se consideran nevi atípicos los que presentan:

- A. Morfología asimétrica.
- B. Bordes irregulares, angulosos y a menudo borrosos.
- C. Variedad de color con áreas marrón claro y oscuro, a veces con fondo rosado e incluso áreas despigmentadas.
- D. Tamaño grande entre > 6 mm de diámetro.

Pueden ser únicos o múltiples, esporádicos o familiares. Se localizan fundamentalmente en el tronco y los brazos aunque pueden aparecer en cualquier otra localización. Los nevi atípicos son bastante estables comparados con el melanoma, evolucionan con el tiempo modificando sus rasgos y acentuando con frecuencia su atipia; no obstante, algunos de ellos, involucionan y desaparecen espontáneamente.

Histológicamente, se caracterizan por desorganización estructural y grados variables de atipia nuclear en los melanocitos, aunque ésta suele ser discontinua y no estar completamente evolucionada. La mera presencia de nevi atípicos, independientemente de la historia familiar, conlleva un mayor riesgo por lo que es necesario un seguimiento clínico e iconográfico de los NM atípicos.

Con el estudio de la naturaleza familiar de los melanomas y de los nevi atípicos, se acuñó el término “**síndrome B - K mole**” en referencia a la primera

inicial de los apellidos de las dos familias en las que fue descrito este síndrome, definido epidemiológicamente por familias en las que dos o más miembros familiares de sangre han sido diagnosticados de melanoma y que varios de sus miembros tienen NM atípicos. En estas familias aproximadamente el 50% de los miembros suelen estar afectados por lo que se considera un síndrome con patrón de herencia autosómico dominante, de penetrancia y expresividad variable. Este síndrome se denominó posteriormente “**síndrome del nevus displásico**” (SND) y actualmente se emplea de forma más extendida el término "**síndrome del nevus atípico**". Los pacientes afectados presentan múltiples nevi que comienzan a aparecer en la adolescencia, aunque pasados los 35 años siguen apareciendo nuevas lesiones. Este síndrome se asocia tanto a melanoma familiar como al esporádico aunque si el paciente tiene antecedentes familiares, el riesgo de desarrollar la enfermedad es prácticamente del 100% por lo que en estos casos es obligatorio realizar revisiones periódicas cada 6 meses y extirpar toda lesión sospechosa. También existe asociación con **nevus congénito gigante** (mayor de 20 cm de diámetro), cuyo riesgo de desarrollar melanoma oscila entre el 5 y 20%.

Según la clasificación de Kraemer, 1983, el SND se subdivide en varias categorías, según la historia personal y familiar y según el riesgo de desarrollar un melanoma (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de Kraemer de Tipos de Síndrome del Nevus Displásico		
Clase	Nombre	Características
A	SND esporádico	Sólo un miembro de la familia tiene SND
B	SND familiar	Dos o más miembros de la familia tienen SND
C	SND esporádico y melanoma	Sólo un miembro de la familia tiene SND y melanoma
D1	SND familiar y melanoma	Dos o más miembros de la familia tienen SND, pero sólo uno melanoma
D2	SND familiar y melanoma	Dos o más miembros de la familia tienen SND y melanoma

Los individuos de la clase A son los que tienen menor riesgo de desarrollar melanoma aunque la probabilidad de desarrollarlo es 27 veces mayor que la de la población general. El riesgo máximo lo tienen los pacientes pertenecientes a la clase D2 en los que la probabilidad de desarrollar un melanoma es 148 veces mayor que la de la población general.

5.1.4. Léntigo maligno (LM)

El léntigo maligno (LM) es también denominado “**nevus melanótico de Hutchinson**”. Muchos autores lo consideran un melanoma pre-invasor inducido por el efecto acumulativo a largo plazo de la radiación UV. Su incidencia es máxima en zonas más soleadas. Aparece en personas mayores, constituyendo máculas grandes, de forma y pigmentación irregular y poco delimitada y la mayoría surgen en cabeza y cuello, sobre todo en la nariz y en pómulos, aunque crecen lentamente (Figura 3).

Bajo una epidermis atrófica se observa proliferación de melanocitos atípicos en fila única en la unión dermoepidérmica. Hay elastosis solar, borramiento de papilas dérmicas, y normalmente se encuentra un infiltrado inflamatorio y es característica la extensión de la proliferación melanocítica al epitelio de los anejos cutáneos. Generalmente, se considera un precursor del **léntigo maligno melanoma (MLM)**, bien sea “**nevus severamente displásico**” o “**melanoma in situ**” (Figura 3); al menos un 5% de los LM progresan a MLM, por lo tanto, está indicada la extirpación quirúrgica y vigilancia posterior, por su tendencia a la recidiva.



Figura 3. Léntigo maligno (LM). Léntigo melanoma maligno (MLM)

5.1.5. Tumor de Spitz

Se trata de una lesión generalmente benigna que se localiza habitualmente en la cara y puede confundirse histológicamente con un melanoma. Aparece generalmente en niños y adolescentes por lo que también se le denomina melanoma juvenil (Figura 4).



Figura 4. Tumor de Spitz

Las lesiones son nódulos rojizos que pueden sangrar con facilidad y alcanzan hasta 1–2 cm de diámetro. Anatomopatológicamente se trata de una proliferación de melanocitos fusiformes o epitelioides que con frecuencia forman nidos en la unión dermoepidérmica y a través de ésta se extienden hacia la profundidad formando cordones. Tiene un patrón de infiltración en cuña que infiltra no sólo dermis sino también anejos y nervios. Las células muestran características particulares, con citoplasma opaco o “en vidrio deslustrado”.

Los tumores de Spitz que muestran características aberrantes en su componente epidérmico o dérmico se denominan **tumores de Spitz atípicos** y aunque tienen un comportamiento benigno en general, incluso las variantes atípicas, en algunos casos han presentado recidiva y metástasis, llegando a ocasionar la muerte. A estas lesiones se les ha denominado tumores de Spitz malignos o metastatizantes y suelen ser de tamaño grande (> 1 cm) con extensión en profundidad y celularidad prominente.

El **nevo azul maligno** es un tumor excepcional que puede originarse de un nevo azul o ser maligno desde un principio (Figura 5). Difiere del MM porque histológicamente hay ausencia de actividad en la unión. Además de los signos habituales de malignidad, como el desarrollo invasor, la atipia, el pleomorfismo de los núcleos y la existencia de mitosis anormales, el nevo azul maligno muestra zonas de necrosis (González-Campora et al., 1994).



Figura 5. Nevo azul

Halo nevus de Sutton: clínicamente se caracteriza por ser un nevus melanocítico adquirido, rodeado de un halo hipopigmentado blanquecino (Figura 6). El halo nevus representa una reacción citotóxica contra los melanocitos y se asocia



Figura 6. Halo nevus de Sutton

histológicamente con un denso infiltrado inflamatorio linfocítico en la porción dérmica del nevus. El fenómeno de halo puede llegar a hacer desaparecer completamente el nevus, dejando un área despigmentada que dura varios años. Ocasionalmente son múltiples y pueden mostrar una mayor tendencia al desarrollo de vitíligo.

Nevus Spilus o nevus moteado, la lesión consiste en una mácula pigmentada con áreas nevoides papulares, hiperpigmentadas en el centro de la mácula.

Nevus de Ota y de Ito: El **nevus de Ota** (melanocitosis óculo - dérmica) se caracteriza por ser una mácula pigmentada, homogénea, afectando a las primeras ramas del trigémino y a la esclerótica (Figura 7). Es más frecuente en mujeres y orientales. La lesión puede no estar presente en el nacimiento y tiende a persistir a lo largo de la vida. Se caracteriza por la proliferación de melanocitos fusocelulares en dermis y esclerótica. Los pacientes con nevus de Ota tienen un riesgo significativo de desarrollar un melanoma uveal por lo que se recomienda un seguimiento oftalmológico anual.



Figura 7. Nevus de Ota. Nevus de Ito

El **nevus de Ito** es similar al nevus de Ota, pero localizado en las regiones supraclavicular, deltoidea y del omóplato (Figura 7).

5.2. Tipos histológicos y clasificación del melanoma cutáneo

Atendiendo a las características clínicas y anatomopatológicas a finales de la década de los 60, Clark y sus colaboradores propusieron una clasificación en relación a su localización anatómica y a los patrones de crecimiento (Tabla 4 y Figura 8). A saber:

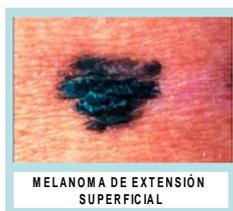
1. Melanoma lentigo maligno (MLM)
2. Melanoma de extensión superficial (MES)
3. Melanoma lentiginoso acral (MLA)
4. Melanoma Nodular (MN)

Las tres primeras entidades, MLM, MES y MLA, tienen una fase intraepidérmica larga y radial y el tumor está limitado a la epidermis. Sin embargo, el MN tiene una fase de crecimiento intradérmico muy corto con paso al crecimiento vertical (dérmico) rápido.

Tabla 4. Características clínicas de los principales tipos clínico - patológicos de melanoma cutáneo primario

Tipo de melanoma	Frecuencia (Caucásicos)	Localización más frecuente	Relación con fotoexposición	Asociación a <i>nevus</i>
Melanoma de extensión superficial	40-70%	Tronco, extremidades	Exposición intermitente (1)	Frecuente
Melanoma Léntigo maligno	4-10%	Cara y cuello	Exposición continua (2)	No habitual
Melanoma lentiginoso acral	2-8%	Manos, pies y uñas	No	No habitual
Melanoma nodular	15-30%	Tronco, extremidades	No	Ocasional

1. Habitualmente recreacional
2. Habitualmente profesional

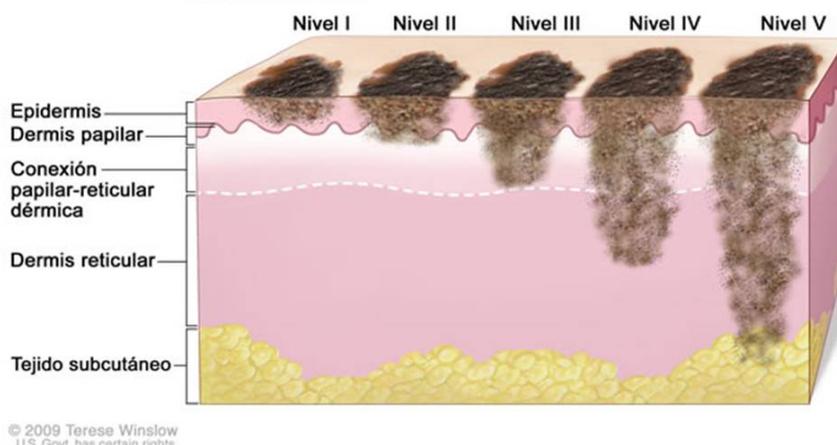


Hay otras formas menos frecuentes como el **melanoma de mucosas** que puede tener localización en la mucosa genital, oral, tubo digestivo o conjuntiva ocular, estos suelen tener una fase de crecimiento radial o pagetoide semejante a la del melanoma de crecimiento superficial; el **melanoma desmoplásico**, que es una variante clínico - patológica poco frecuente, que se presenta al inicio como una lesión banal pero evoluciona a un tumor profundo, fibroso, con predominio de células fusiformes, con tendencia a las recidivas locales múltiples y con gran capacidad de infiltración local y desarrollo de metástasis; y, por último, el **melanoma ocular** que supone menos del 5% de los melanomas y no parece guardar relación con la exposición al sol, suele presentarse en la coroides, el cuerpo ciliar y, raramente, al iris y tiene un patrón de mutaciones que difiere del de los cutáneos o mucosos; además, la mortalidad en estos es elevada por la tendencia a la diseminación, especialmente hepática.

Histológicamente el melanoma consiste en una proliferación tumoral melanocítica atípica acompañada de cambios epidérmicos y respuesta inflamatoria, generalmente con un infiltrado inflamatorio en bandas, a menudo entremezclado con melanófagos situados debajo del tumor. En los tumores que invaden la dermis el infiltrado se extiende hasta la epidermis.

En las fases iniciales la proliferación de melanocitos atípicos está confinada en la epidermis (**melanoma *in situ*, MIS**), con presencia de melanocitos en todos los niveles epidérmicos, sin invasión de la dermis papilar, que clínicamente forma una mancha de extensión radial (**crecimiento radial u horizontal, intraepidérmico**). Los melanocitos atípicos se disponen individualmente en nidos de tamaño y forma heterogénea. En esta fase se encuentran el MLM, el MES y el MLA.

A medida que la lesión progresa, los melanocitos malignos que se originan en la epidermis proliferan extendiéndose hacia la dermis papilar invadiendo la dermis reticular y la grasa subcutánea (**crecimiento vertical, intradérmico**), observándose en ellas células tumorales sueltas y en nódulos de tamaño y forma variable. En esta fase el tumor adquiere la capacidad de metastatizar.

Figura 8. Niveles de Clark.

Las células del melanoma son de morfología variable, cuboidales o fusiformes y suelen mostrar ausencia de maduración nuclear (reducción del tamaño nuclear en profundidad) así como mitosis y necrosis celular. Los melanomas se acompañan de una respuesta inflamatoria con presencia de infiltrado inflamatorio de predominio linfo-histiocitario que puede ser variable en su distribución e intensidad. Otro hallazgo histológico característico del melanoma es la observación de fenómenos de regresión histológica que consisten en la presencia de un denso infiltrado inflamatorio con presencia de melanófagos y áreas variables de fibrosis dérmica.

La progresión de la fase de crecimiento vertical ha permitido definir diferentes niveles de invasión descritos por Clark (Figura 8), a saber:

- **Nivel I**, se caracteriza porque el tumor está limitado a la epidermis y se le conoce también como *MM in situ*.
- **Nivel II**, aquí el tumor invade la dermis papilar y aparecen en ella células tumorales aisladas o pequeños nidos celulares tumorales.
- **Nivel III**, en este nivel los nódulos de células tumorales invaden toda la dermis papilar y se expanden alcanzando la unión de la dermis papilar con la reticular.

- **Nivel IV**, se denomina así cuando el tumor ha invadido la dermis reticular.
- **Nivel V**, en este nivel el tumor ha crecido hasta invadir el tejido subcutáneo.

Los niveles de invasión de Clark (Clark et al.; 1989) junto a otros parámetros como el grosor en milímetros del tumor o el índice de Breslow (Figura 9), la presencia de ulceración, el número de mitosis y la presencia de satelitosis e invasión vascular, son importantes de cara a establecer el pronóstico del melanoma (Breslow et al., 1970; Breslow et al., 1978; Leong et al., 2005). El índice de Breslow se mide con un ocular milimetrado desde la capa granular o fondo de la úlcera si está ulcerado hasta la porción más profunda de invasión, ya sea el borde del tumor o un grupo aislado de células. Tomado de forma aislada, actualmente se considera a este índice el indicador pronóstico más valioso. Según el gráfico de la Figura 9, los tumores con espesor menor de 0,75 mm tienen sobrevida de 90 a 95%, los que tienen un espesor entre 0.7 – 1.69 mm sobreviven el 70 – 90%, los que están entre 1.70 – 3.60 mm sobreviven el 40 – 85% y los que tienen un espesor mayor de >3.61 mm tienen una supervivencia del 20 – 70% a los 5 años (Balch et al., 2001a).

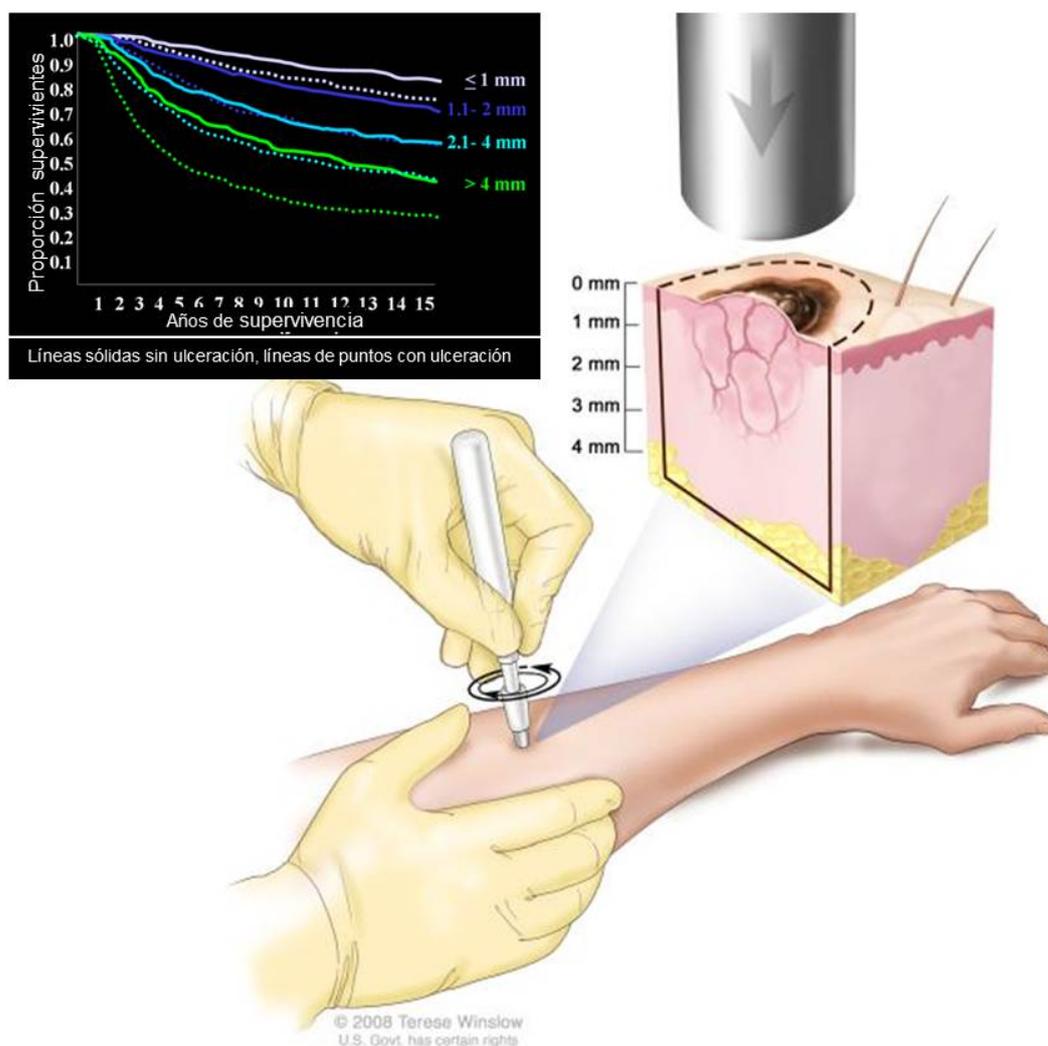


Figura 9. Medición del índice de Breslow. Se mide en mm con ocular milimetrado y curvas de supervivencia. Líneas continuas sin ulceración, líneas de puntos con ulceración.

Como se mencionó anteriormente el melanoma tiene un comportamiento biológico característico con un crecimiento intraepidérmico y un crecimiento dérmico. En la fase de crecimiento dérmico, el melanoma tiene capacidad de producir metástasis. El desarrollo de metástasis es el resultado de una serie de eventos que incluyen la existencia de células separadas del tumor primario, la invasión de la membrana basal, la migración hacia el torrente sanguíneo o a la circulación linfática por donde pueden llegar a producir la invasión y crecimiento en otros órganos (Cochran et al., 2006). El pronóstico del tumor cambia de forma significativa dependiendo de la fase de crecimiento o invasión que presente, así como

de si la enfermedad es local o si existe afectación linfática o visceral. Por ello, tras el diagnóstico de melanoma, se debe proceder a su estadiaje con fines pronósticos y terapéuticos.

5.2.1. Melanoma de extensión superficial (MES)

El MES es el tipo de melanoma más frecuente y representa un 40 - 70% en pacientes Caucásicos. Aunque puede aparecer en cualquier zona del cuerpo, su localización más común es el tronco (especialmente en varones) y las extremidades inferiores (especialmente en mujeres), siendo la forma que se asocia con mayor frecuencia a la presencia de nevus clínicamente atípicos y a exposiciones solares de carácter intermitente. Puede verse en jóvenes, aunque el pico máximo de incidencia se sitúa entre los 40 y 60 años y, generalmente, tiene una evolución de 1 ó 5 años.

Clínicamente se manifiesta como una lesión maculo-papulosa de intensa coloración marrón, negra o parduzca de 1 a 2,5 cm de diámetro que puede llegar a alcanzar tamaños de 8 a 10 cm, palpable, con bordes y superficie irregulares que puede presentar áreas claras que reflejan regresión del tumor (Tabla 4). La presencia de color blanco grisáceo en el centro de la lesión pigmentada es un hallazgo muy sugerente de este tipo de melanoma. Cumple todas o algunas de las reglas ABCD descritas en la Tabla 2 (Swetter, 2010).

En la fase de crecimiento radial este tipo de melanoma muestra proliferación de melanocitos atípicos bastante uniformes, aislados y en grupos, en todos los niveles de la epidermis, pero también puede verse invasión focal de la dermis papilar por células aisladas o pequeños grupos. Puede asociarse a esta fase un infiltrado denso y superficial de linfocitos maduros y fibrosis de la dermis papilar.

En la fase de crecimiento vertical, los melanocitos malignos ocupan la dermis papilar y se extienden profundamente hacia dermis reticular y tejido celular subcutáneo. Coincidiendo con esta fase de crecimiento se desarrollan uno o varios nódulos prominentes sobre la lesión, de color variable, que suelen acabar ulcerándose (Álvarez-Mon et al., 2005).

Aproximadamente el 50% de los pacientes tienen historia de un nevus aparentemente benigno en el sitio del melanoma. Los casos de tumores primarios

múltiples (el 5% de los melanomas) suelen ser de este tipo clínico-patológico y deberán ser vigilados estrechamente y descartar la presencia de nevus atípicos personales o en sus familiares.

5.2.2. Melanoma léntigo maligno (MLM)

La frecuencia del MLM oscila entre el 4 - 15% de todos los melanomas en caucasoides y es raro en la raza asiática. Se localiza generalmente en cara, región facial, temporal y cuello y aparece sobre todo en personas mayores y se relaciona con la exposición solar (Tabla 4).

Entre los factores de riesgo se incluye el reordenamiento de genes del cromosoma 10, específicamente en la región 10q24-26, la terapia de estrógenos y progesterona y la aplicación de tintes de pelo no permanentes. La edad media del diagnóstico es de 65 años aunque la edad de aparición está bajando; afecta con más frecuencia al sexo femenino en una proporción de 4:1 y no se asocia a la presencia de nevus clínicamente atípicos (Álvarez-Mon et al., 2005).

Clínicamente, se desarrolla sobre un **léntigo maligno de Hutchinson** (o **melanosis de Dubreuilh**) que suele permanecer sin adquirir capacidad invasiva de 5 a 15 años o más y se manifiesta como una mancha hiperpigmentada, policroma, en la que es difícil establecer el límite con la piel sana.

Las lesiones de MLM suelen ser mayores de 3 cm, tienen bordes contorneados con indentaciones, son notablemente planas en las fases iniciales y cuando se hacen palpables indican una invasión dérmica. Pueden existir variantes amelanóticas.

Histológicamente, en las áreas no invasivas de MLM y en todo el lentigo maligno (LM), la parte inferior de la epidermis muestra proliferación de melanocitos atípicos, como células aisladas y en grupos. Melanocitos atípicos surgen en la epidermis atrófica, sobre una dermis dañada por el sol, y con frecuencia se extienden en profundidad a lo largo de los folículos pilosos (Swetter, 2010).

El riesgo de desarrollar MLM a partir del LM es de un 4,7% a los 45 años y de un 2,2% a los 65 años. Cuando aparece se utiliza el término de MLM y el tumor ha desarrollado la capacidad de metastatizar.

La diferencia entre LM y MLM se basa fundamentalmente en la fase de crecimiento vertical de ese último, lo cual lo convierte en un microinvasor; en cambio, el LM se encuentra limitado a la epidermis y no sobrepasa la membrana basal, por lo cual sólo presenta crecimiento radial. El desarrollo de un nódulo sobreelevado, generalmente de color pardo-negrusco, proclama el comienzo de la invasión (Álvarez-Mon et al., 2005; Swetter, 2010).

La regresión es una característica de este tumor y se expresa por áreas de color gris o blanco. En ocasiones es tan marcada que mientras crece en un sentido remite en otra zona y al paciente tiene la sensación de que se desplaza por la piel (Álvarez-Mon et al., 2005).

5.2.3. Melanoma lentiginoso acral (MLA)

El MLA constituye el 2 - 8% de los melanomas en individuos Caucásicos, en la raza negra la proporción se incrementa hasta un 60 - 72%, en la oriental representa un 29 - 46% y en igual modo en los indios americanos (Swetter, 2010). Como su nombre indica, se localiza predominantemente en palmas, plantas, en la matriz y/o lecho ungueal y en mucosas o uniones mucocutáneas. Aparece como una mácula parda, marrón o negra, con bordes irregulares, en la superficie palmar o plantar. Es más frecuente en varones, a partir de los 50 o 60 años de edad. Como en los otros tipos de melanoma, su evolución natural, si no se extirpa, lleva al desarrollo de un nódulo con tendencia a la ulceración y hemorragia. Sin embargo, la evolución es más corta que en otros tipos de melanoma y varía desde unos pocos meses hasta varios años, con una media de 2,5 años.

Se observan fases de crecimiento tanto radial como vertical, pero ésta última sucede a la primera con más rapidez que en MLM y en MES. Es un tumor muy agresivo, con gran tendencia a las metástasis ganglionares y una alta mortalidad. Puede presentarse con un nivel III o IV y no tener nódulo tumoral o su elevación apenas es perceptible (Álvarez-Mon et al., 2005).

Una variante del MLA es el **melanoma subungueal** que constituye el 2 - 3% de los melanomas en la raza blanca y el 15 - 20% de los melanomas en la raza negra. Incide en ambos sexos por igual, y en edades sobre todo entre 55 y 65 años. Más del 75% de estas lesiones aparecen en el primer dedo de la mano o del pie y comienzan como una mancha en el lecho ungueal, cerca de la base, que se confunde fácilmente con un hematoma subungueal. Cuando se ve afectado el pliegue posterior de la uña (signo de Hutchinson) es un signo de mal pronóstico e indicativo de que el tumor está avanzado. El 10 - 15% son amelanóticos y con apariencia carnosa. El pronóstico de los melanomas subungueales es malo debido a que el diagnóstico suele ser tardío pero no a consecuencia de su naturaleza biológica. Esta lesión posee melanocitos uniformemente atípicos y grandes a lo largo de la unión dermoepidérmica, con una epidermis hiperplásica (Álvarez-Mon et al., 2005; Swetter, 2010).

5.2.4. Melanoma nodular (MN)

El MN constituye el segundo tipo más frecuente de melanoma (15 - 30%) en individuos caucásicos. Este término sólo se debe aplicar a las lesiones que comienzan por un nódulo tumoral desde la fase más inicial en que es reconocible. Tiene gran capacidad de crecimiento vertical, por lo que resulta un tipo de melanoma más agresivo, con mayor tendencia a metastatizar y por lo tanto de peor pronóstico. Puede aparecer en cualquier localización, pero es más frecuente en espalda (especialmente en varones) o extremidades (especialmente en mujeres), en personas de 40 - 60 años. Aparece generalmente como una pápula o nódulo de coloración uniforme negro-azulada, de 1 a 2 cm de diámetro, suele crecer rápidamente y presenta una alta probabilidad de ulceración. Aproximadamente el 5% de los MN carecen de pigmento y tienen aspecto carnoso. Puede ser difícil distinguir entre MN y hemangioma, hematoma, granuloma piógeno, nevus azul, poroma ecrico o carcinoma basocelular pigmentado. Por otra parte, suele eludir el diagnóstico temprano por carecer de los signos típicos de alarma de melanoma ABCD (Álvarez-Mon et al., 2005; Swetter, 2010).

Microscópicamente, el melanoma nodular es un tumor en el que el crecimiento intraepidérmico siempre va asociado a invasión dérmica y hay una variante polipoide con pedículo y aspecto de coliflor que es especialmente agresiva.

Los MES, MLM y MLA en su estadio *in situ* (MIS), aunque histopatológicamente son formas malignas se comportan biológicamente como formas benignas con un pronóstico excelente. Durante el estadio *in situ* la diferenciación histológica es habitualmente clara aunque, en algunos casos, cuando se desarrolla el melanoma invasivo, el componente *in situ* puede modificarse sustancialmente y hacer más difícil su diferenciación.

5.3. Estadificación clínica del melanoma

La estadificación clínica del melanoma se estableció con objeto de disponer de un sistema uniformemente aceptado que permitiese comparar los resultados de respuesta al tratamiento y establecer factores pronóstico. Desde los años 50 se han realizado diversos intentos de estadificación clínica del melanoma. En 1978 la American Joint Committee on Cancer (AJCC) publicó un sistema de estadificación microscópico del melanoma, conocido como “Clasificación TNM del melanoma cutáneo” basado en el estudio del tumor considerando datos clínicos e histopatológicos en relación a ciertas características del tumor (T), como el espesor del mismo, la presencia o no de ulceración, la presencia y número de ganglios linfáticos afectados (N), la existencia de micro o macrometástasis y la presencia o no de metástasis a distancia (M) (Tabla 5).

Según esta clasificación, los estadios patológicos I y II comprenden pacientes sin evidencia de metástasis regional ni a distancia, con base en la ausencia de compromiso tumoral después de realizar un examen histopatológico de los ganglios y los exámenes radiológicos y clínicos de rutina. El estadio III corresponde a pacientes con evidencia histopatológica de metástasis regionales; esta estadificación requiere que el patólogo reporte el número de ganglios extraídos, el número de ganglios examinados y, de éstos, cuántos están comprometidos. El estadio anatomopatológico IV incluye pacientes con confirmación histológica de metástasis en uno o más sitios distantes por ejemplo, en piel, tejidos subcutáneo, nodular, visceral, esquelético o en el sistema nervioso central. En la clasificación TNM se hace referencia a la presencia de micro y macrometástasis; la micrometástasis se diagnostica después de una linfadenectomía electiva o centinela (es decir, del primer ganglio linfático regional

que recibe la linfa de la zona donde se asienta el tumor primario) y la macrometástasis se define como metástasis ganglionar clínicamente detectable y confirmada mediante linfadenectomía terapéutica o cuando cualquier metástasis hacia los ganglios linfáticos exhibe una masiva extensión extracapsular (Thompson, 2002; Rousseau et al., 2004).

La clasificación AJCC ha sido sometida a distintas revisiones en los años 1983, 1988, 1992, 2002, 2005 y por último en 2009 (Balch et al., 2001b; Thompson, 2002; Kim et al., 2002; Petro et al., 2004; Gimotti et al., 2005; Retsas et al., 2007; Balch et al., 2009). La revisión más importante fue hecha en el 2002 y en ella, para la estadificación, se incluyeron la ulceración y el número de ganglios linfáticos implicados en lugar del tamaño de los mismos (Kim et al., 2002). En esta clasificación los niveles de Clark se consideraron sólo en el espesor de los tumores primarios; además, las metástasis microscópicas de los nódulos linfáticos regionales detectados principalmente por la biopsia del ganglio linfático centinela se diferenciaron de las metástasis macroscópicas palpables de los nódulos linfáticos (Thompson, 2002; Rousseau et al., 2004). Por otra parte, incluyen los niveles séricos de lactado deshidrogenasa (LDH) como el factor pronóstico más importante en los melanomas en estadio IV (Tabla 6) (Kim et al., 2002; Balch et al., 2009).

No obstante, a partir de 2009, la AJCC considera válidos todos los parámetros descritos anteriormente salvo el nivel de Clark, para la clasificación del melanoma con objeto de evaluar el pronóstico de los pacientes según el estadiaje del tumor y recomienda incorporar el índice de mitosis por mm^2 como factor predictivo, ya que está comprobado que un alto índice de mitosis se correlaciona con una pobre supervivencia; de hecho, es el parámetro independiente con más valor de predicción sobre la supervivencia tras el índice de Breslow (Leong et al., 2005; Thompson et al., 2011). Atendiendo a este parámetro los melanomas de la categoría T1 de la AJCC se han reclasificado en T1a y T1b, siendo los melanomas T1a (aproximadamente 60% de los pacientes T1) los tumores que tienen ≤ 1 mm de grosor, no presentan ulceración y tienen un tasa de mitosis $<1/\text{mm}^2$ y los melanomas clasificados como T1b melanomas (aproximadamente 40% de los pacientes T1) tienen ≤ 1 mm de grosor y tienen al menos 1 mitosis mm^2 o presentan ulceración (Balch et al., 2009;

Thompson et al., 2011). Gracias a este modelo de estadificación ha sido posible clasificar a los pacientes en subgrupos homogéneos que facilita su inclusión en ensayos clínicos y la comparación de resultados para su información sobre el pronóstico.

En el estadiaje microscópico del tumor existen dos hallazgos histológicos que tienen una gran importancia en el pronóstico y que son el grosor tumoral y la presencia de ulceración (Balch et al., 2001a, Gimotti et al., 2005). La ulceración es la ausencia histológica de epidermis por encima del tumor y el grosor tumoral se establece utilizando dos sistemas, uno definido por el grado anatómico de la infiltración local cutánea o niveles de invasión de Clark (Figura 8) y otro basado en la medición del grosor vertical en milímetros o índice de Breslow (Figura 9).

El índice de Breslow se considera el factor pronóstico más importante en los estadios I y II del melanoma, aunque para definir el pronóstico real es necesario evaluar otros factores de la enfermedad. La AJCC estadifica el grosor del tumor en cuatro categorías: $\leq 1,0$ mm; 1,01 a 2,0 mm; 2,01 a 4,0 mm y $>4,0$ mm y relaciona la medida del índice Breslow en forma directa con el volumen del tumor, lo que explica su exactitud como medida de pronóstico. Para la correcta clasificación del microestadio del tumor primario se requiere una evaluación histológica concienzuda del tumor por un patólogo experimentado. Los cálculos pronósticos deberán modificarse de acuerdo al sexo y sitio anatómico, así como también de acuerdo con la evaluación clínica e histológica (Gimotty et al., 2005).

Además de los marcadores pronóstico y de susceptibilidad descritos existen importantes esfuerzos en el mundo científico para conocer el valor potencial de ciertos biomarcadores que puedan aportar información sobre la susceptibilidad a padecer la enfermedad, el riesgo de progresión de la misma y la respuesta al tratamiento de este tumor cuya frecuencia sigue creciendo año tras años (Thompson, 2005). Entre estos factores pueden tener relevancia los genes HLA y KIR.

Tabla 5. Definiciones TNM (adaptada de Kim et al., 2002 y Balch et al., 2009)

Tumor primario (T)	
TX	No puede evaluarse el tumor primario (por ejemplo, biopsia de raspado o melanoma que ha regresado)
T0	No hay prueba de tumor primario
Tis	Melanoma in situ
T1	Tumor mide 1,0 mm o menos de grosor, con ulceración o sin ella
T1a	Tumor mide 1,0 mm o menos de grosor y en el grado II o III de Clark sin ulceración Tumor mide 1,0 mm o menos de grosor, tasa de mitosis <1/mm ² y sin ulceración (desde 2009)
T1b	Tumor mide 1,0 mm o menos de grosor y el grado IV o V de Clark con ulceración Tumor mide 1,0 mm o menos de grosor, tasa de mitosis ≥1/mm ² con ulceración (desde 2009)
T2	Tumor mide más de 1,0 mm pero menos de 2,0 mm de grosor con ulceración o sin ella
T2a	Tumor mide más de 1,0 mm pero 2,0 mm o menos de grosor sin ulceración
T2b	Tumor mide más de 1,0 mm pero 2,0 mm o menos de grosor y con ulceración
T3	Tumor mide más de 2,0 mm pero 4,0 mm o menos de grosor con ulceración o sin ella
T3a	Tumor mide más de 2,0 mm pero 4,0 mm o menos de grosor sin ulceración
T3b	Tumor mide más de 2,0 mm pero 4,0 mm o menos de grosor, con ulceración
T4	Tumor mide más de 4,0 mm de grosor con ulceración o sin ella
T4a	Tumor mide más de 4,0 mm de grosor sin ulceración
T4b	Tumor mide 4,0 mm o menos de grosor con ulceración
Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX	No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis de los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis a un solo ganglio linfático
N1a	Metástasis (microscópica) clínicamente oculta
N1b	Metástasis (macroscópica) clínicamente obvia
N2	Metástasis a 2 o 3 ganglios regionales o metástasis regional intralinfática sin metástasis nodal
N2a	Metástasis (microscópica) clínicamente oculta
N2b	Metástasis (macroscópica) clínicamente obvia
N2c	Metástasis satélite o en tránsito sin metástasis a los ganglios linfáticos
N3	Metástasis en más de cuatro ganglios regionales, ganglios filtrados o metástasis en tránsito o metástasis en satélite(s) con ganglios regionales metastásicos
Metástasis a distancia (M)	
MX	No puede evaluarse la metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis a la piel, tejidos subcutáneos, o ganglios linfáticos distantes
M1b	Metástasis pulmonar
M1c	Metástasis a otros sitios viscerales o metástasis a distancia a cualquier sitio relacionado con una deshidrogenasa de suero láctico elevada

Tabla 6. Tasas de supervivencia del melanoma según su clasificación TMN y estadio AJCC (adaptada de Balch et al., 2001)

Estadios	Clasificación TNM	Características Histológicas	Supervivencia%1		
			1 año	5 años	10 años
0	T0 N0 M0	No evidencia de tumor			
Tis	Tis N0 M0	Intraepitelial o melanoma <i>in situ</i>	100	100	100
1	Tis N0 M0	Tumor < 1 mm			
IA	T1a N0 M0	< 1 mm sin ulceración y nivel II/III de Clark	99.9	98.9	97.4
IB	T1b N0 M0	< 1 mm, ulceración, nivel Clark IV/V	99.3	93.7	90.2
	T2a N0 M0	1,01 - 2 mm sin ulceración	99.6	90.5	84.1
IIA	T2b N0 M0	1,01 - 2 mm con ulceración	96.0	76.6	65.2
	T3a N0 M0	2,01 - 4 mm sin ulceración	98.2	77.7	67.3
IIB	T3b N0 M0	2,01 - 4 mm con ulceración	95.2	70.5	62.1
	T4a N0 M0	>4 mm sin ulceración	95.8	66.8	56.3
IIC	T4b N0 M0	>4 mm con ulceración	93.0	55.7	47.5
IIIA	T1 - 4a N1a M0	1 micrometástasis nódulo regional, no ulceración	94.6	69.5	63.0
	T1 - 4a N2a M0	2 - 3 micrometástasis nódulo regional, no ulceración	95.8	63.3	56.9
IIIB	T1 - 4b N1a M0	1 micrometástasis nódulo regional, ulceración	91.0	52.8	37.8
	T1 - 4b N2a M0	2 - 3 micrometástasis nódulo regional, ulceración	92.0	49.6	35.9
	T1 - 4a N1b M0	1 macrometástasis nódulo regional, no ulceración	94.3	58.6	49.7
	T1 - 4a N2b M0	2 - 3 macrometástasis nódulos regionales, no ulcerado.	92.1	49.9	43.6
	T1 - 4a/b N2c M0	Metástasis en tránsito/ lesión satélite(s) sin nódulo linfático metastásico	93.2	67.6	59.2
IIIC	T1 - 4b N1b M0	1 nódulo regional macroscópico, ulceración	95.0	52.2	36.6
	T1 - 4b N2b M0	2 - 3 nódulos regionales macroscópicos, ulceración	84.0	32.9	32.9
	cualquier T N3 M0	≥ 4 nódulos macro/micrometastásicos regionales o ganglios adyacentes agrupados o metástasis en tránsito o metástasis en satélite(s) en ganglios regionales cercanos, con o sin ulceración	74.4	27.3	22.4
IV	cualquier T cualquier N M1a	Diseminación a distancia en piel, metástasis nodulares con LDH normal	59.3	18.8	15.7
	cualquier T cualquier N M1b	Metástasis pulmonares con LDH normal	57.0	6.7	2.5
	cualquier T cualquier N M1c	Metástasis en otras vísceras con LDH normal o cualquier metástasis a distancia con LDH elevada	40.6	9.5	6.0

6. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) es un conjunto de genes altamente polimórfico los cuales codifican un amplísimo grupo de moléculas diferentes que son esenciales para que los individuos puedan adaptarse a las agresiones del entorno y que constituyen uno de los principales soportes del sistema inmunitario (Dunham et al., 1989; Kumanovics et al., 2003).

En humanos este complejo se denomina HLA (acrónimo inglés de *Human leukocyte Antigen*) y sus más de 224 genes identificados están localizados en la región 6p21.3 del brazo corto del cromosoma 6 (Figura 10). Aunque no se conoce la función de muchos de ellos, aproximadamente el 40 % parecen estar involucrados en el funcionamiento del sistema inmunológico (*The Consortium HLA*, 1999). Su alto grado de polimorfismo se debe al elevado número de variantes alélicas y al elevado número de loci existentes (Klein et al., 2000a; Klein et al., 2000b). Clásicamente, las variantes alélicas se definieron por técnicas serológicas (microlinfocitotoxicidad) y la denominación de las mismas se ha realizado por consenso en las diferentes reuniones mantenidas desde 1968 por un Comité de expertos, el *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*. Así, los alelos se denominan con una letra que se refiere al loci al que pertenecen seguidos de un número que se corresponde con una especificidad en particular (Marsh et al., 2012). De este modo se han descrito mapas con las distintas regiones y locus del sistema HLA (Campbell et al., 1993).

Los genes de HLA-I y HLA-II codifican glicoproteínas de membrana, las moléculas de HLA clase I (HLA-I) y las moléculas HLA de clase II (HLA-II), especializadas en la presentación de antígenos y otras moléculas implicadas en las vías biosintéticas de las propias moléculas del HLA, como HLA-DM, HLA-DO, Transportadores asociados al procesamiento antigénico (TAP, del inglés, *Transporters associated with Antigen Processing*) o los componentes del proteasoma LMP-2 y LMP-7 (del inglés, *Large Multifunctional Proteasome*) (Kelly et al., 1991). La región intermedia o región de clase III contiene genes que codifican una gran variedad de proteínas, incluyendo citoquinas, componentes del sistema del complemento o proteínas de shock térmico (HSP, del inglés *Heat Shock proteins*).

Por otra parte, dentro de la región de clase III existen otros muchos genes cuya función aún se desconoce.

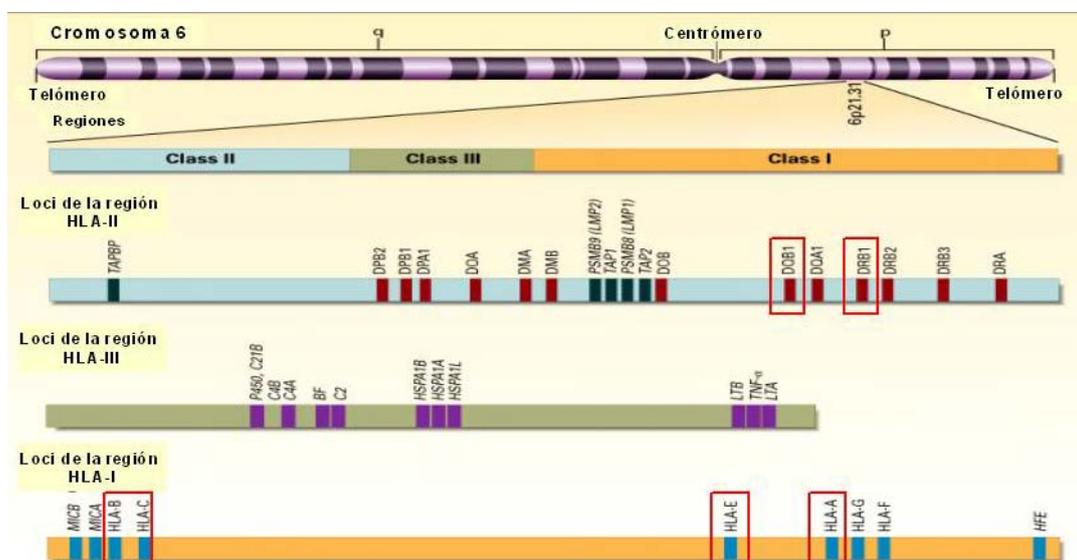


Figura 10. Localización y organización del sistema HLA en el cromosoma 6. En el brazo corto del cromosoma 6 humano existe un conjunto de genes que se distribuyen en tres regiones bien diferenciadas. Región de clase I que codifica las moléculas de histocompatibilidad de clase I clásicas (HLA-A, HLA-B y HLA-C), así como moléculas no clásicas (HLA-E, HLA-G y HLA-F). La región de clase II codifica moléculas de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP). Por último, la región de clase III codifica moléculas de características estructurales y funcionales totalmente diferentes. (Adaptado de Klein J, Sato A. *N Engl J Med.* 2000a; 343:702-9).

6.1. Moléculas HLA de clase I

En la región HLA-I hay unos 20 genes que codifican las moléculas de clase I (Kumanovics et al., 2003). El prototipo de gen que las codifica se encuentra dividido en 8 exones y cada uno de ellos se corresponde con cada dominio estructural de la molécula (Figura 11) (Lefranc et al., 2005). Se conoce con precisión la función de las tres familias de antígenos de histocompatibilidad de clase I que codifican para las moléculas HLA-I clásicas o HLA-Ia, denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C cuyo cometido es presentar péptidos a las células T y juegan un papel relevante en la discriminación de lo propio y de lo no-propio. No ocurre lo mismo con las otras moléculas HLA-I denominadas no-clásicas o HLA-Ib que poseen alta similitud con las anteriores pero tienen menor polimorfismo (oligomórficas) y su expresión es variable tanto en su distribución tisular como su la densidad en la membrana celular

(Rodgers et al., 2005). Dentro de estas moléculas HLA-Ib están las moléculas HLA-E, HLA-F y HLA-G que, además de presentar péptidos, se sabe que están involucradas en los fenómenos de inmunoregulación constituyendo puentes entre la inmunidad innata y la adquirida. Existen otros grupos de moléculas HLA I no-clásicas como MICA, MIC-B y Hfe que están codificadas por genes del cromosoma 6 y también las moléculas CD1, MR1, codificadas por genes localizados en el cromosoma 1 y el FcRn (receptor neonatal para el Fc) que están codificadas por genes localizados en el cromosoma 19 (Kumanovics et al., 2003; Rodgers et al., 2005). Algunos autores han propuesto nominar a las moléculas Hfe y MIC moléculas HLA Ic y a las moléculas CD1, MR1, FcRn como clase HLA1d (Martinez-Naves et al. 2001).

Gracias a la introducción de las técnicas de biología molecular, en particular las derivadas de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR, del inglés, *polymerase chain reaction*), se ha logrado secuenciar las distintas variantes alélicas conocidas en la actualidad. Los polimorfismos de los alelos no se distribuyen al azar sino que están localizados en regiones específicas donde se sitúan los aminoácidos que interaccionan con los péptidos procesados. Las regiones de variabilidad de los genes HLA de clase I se encuentran en los exones 2 y 3 y las de los que codifican para el HLA de clase II están en el exón 2. Los mecanismos genéticos de la generación de la variabilidad se deben fundamentalmente a conversión génica, mutaciones puntuales y recombinaciones intergénicas (Figura 11).

Cada molécula de clase I es un heterodímero formado por una cadena pesada, glicosilada, con un peso molecular de 43 kD, denominada cadena β ; y una cadena ligera, la beta 2 microglobulina (β 2m), que tiene un peso molecular aproximado de 12.5 kD y se asocia con la cadena α mediante interacciones no covalentes.

La región del cromosoma que contiene todos los genes HLA, a excepción de los que codifican la beta-2-microglobulina, se denomina haplotipo HLA. Por tanto el haplotipo HLA incluye los genes clase I: HLA-A, HLA-B y HLA-C y los genes clase II: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP y otros loci situados también en esta región. Los haplotipos se heredan de padres a hijos y se comportan como un sistema hereditario autosómico y codominante. El amplio polimorfismo potencial que conlleva este

sistema se encuentra limitado por el fenómeno denominado desequilibrio de ligamiento, gracias a cual ciertos alelos de diferentes loci de un mismo haplotipo se asocian con una frecuencia mayor de la esperada.

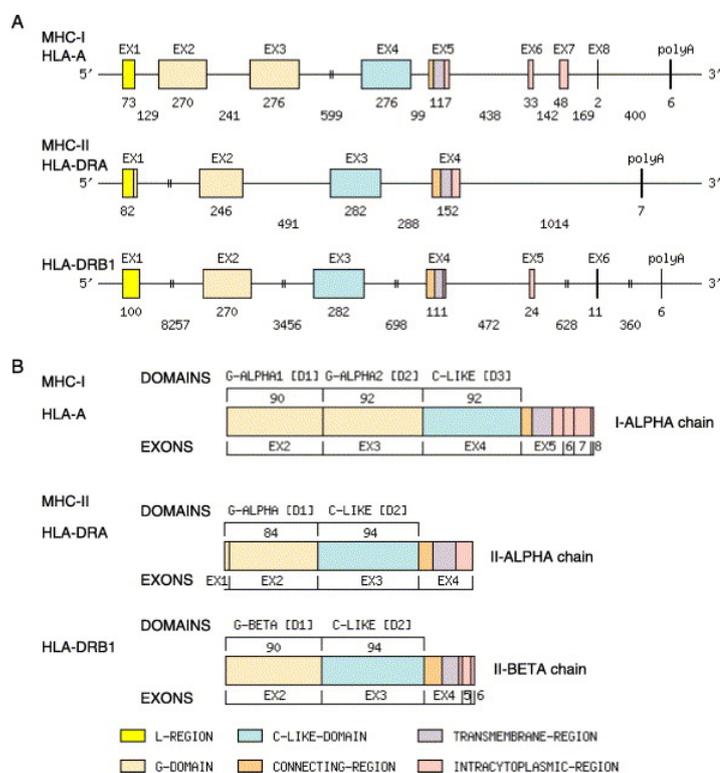


Figura 11. Estructura de los genes humanos HLA-A (HLA-Ia), el HLA-DRA y HLA-DRB1 (HLA-IIa) en el cromosoma 6p21.3. A: Gen HLA-A gen que codifica la cadena I- α de HLA-A (HLA-Ia) en humanos. HLA-DRA gen que codifica la cadena II- α de HLA-DRA (HLA-IIa). HLA-DRB1 gen que codifica la cadena II- β de HLA-DRB1 (HLA-II bis) del ser humano. El tamaño de los intrones y exones se expresa en pares de bases. El signo (- || -) indica que el intrón no está dibujado a escala B: Estructura de los genes humanos HLA-A (HLA-Ia), el HLA-DRA y HLA-DRB1 (HLA-IIa) en el cromosoma 6p21.3. B: Correspondencia entre los exones y los dominios de las moléculas HLA en humanos A - (HLA-Ia), el HLA-DRA y otros HLA-DRB (HLA-IIa). El tallo y los dominios están expresados en número de aminoácidos. (Lefranc et al., 2005).

La cadena α presenta gran variabilidad entre los individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo antigénico de las moléculas de histocompatibilidad clase I (Tabla 7), polimorfismo que facilita la existencia de estructuras ligeramente diferentes que influye en el acoplamiento del péptido (Figura 13) y tiene efectos funcionales en el reconocimiento antigénico por los linfocitos T (Lim et al., 2003). En la cadena α se distinguen tres zonas bien definidas, una zona

extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, hidrófoba y una región intracitoplasmática de unos 35 aminoácidos.

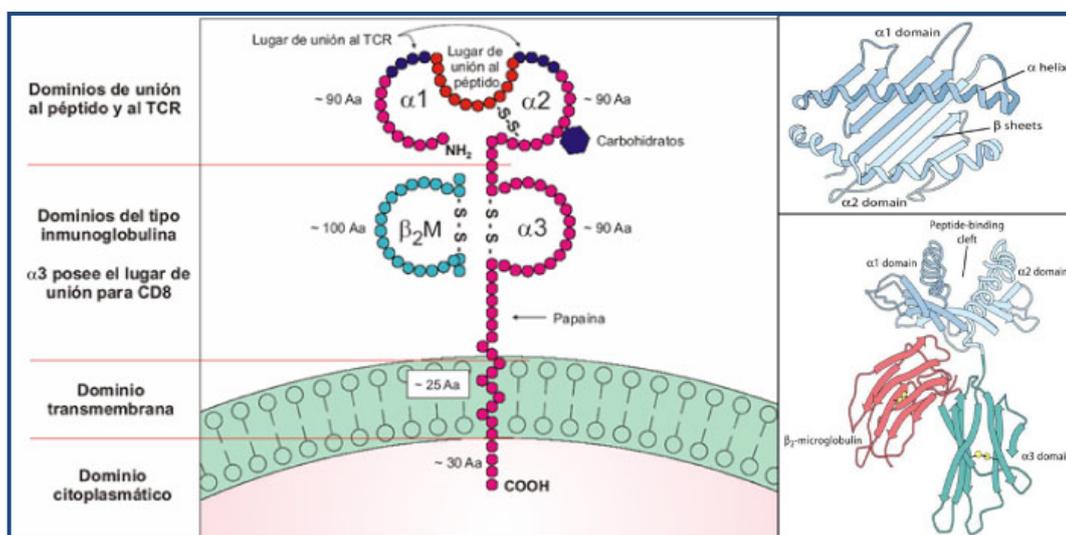


Figura 12. Estructura de las moléculas HLA de clase I. La moléculas de Clase I posee una cadena ligera, la beta - 2 - microglobulina (β - 2m) extracelular y una cadena pesada, la cadena alfa (α), que posee dos dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que conforman la hendidura donde se acopla el péptido, una región extracelular que es un dominio es del tipo inmunoglobulina ($\alpha 3$), una región transmembrana y un tallo citoplasmático.

La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de aproximadamente unos 90 residuos cada uno, denominados dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, mantenidos por la existencia de puentes intracatenarios. Los residuos glucídicos se encuentran unidos a un residuo la asparragina en la posición 86 del dominio $\alpha 1$. La estructura tridimensional del dominio alfa-3 y la beta-2-microglobulina están organizados en estructura de *hoja plegada beta* y la estructura de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ consta de una parte formada por cuatro fragmentos en estructura de *hoja plegada beta* seguido de otro segmento organizado en forma de *alfa - hélice*. Esta peculiar organización delimita una hendidura denominada “bolsillo” o sitio de unión al péptido (en inglés, *peptide binding groove*) en el que los residuos más polimórficos se encuentran en la base y las paredes de la hendidura (2003 Kumanovics et al., 2003; Lim et al., 2003).

En esa hendidura se acoplan péptidos antigénicos de aproximadamente 8 - 10 aminoácidos procedentes de proteínas endógenas previamente procesadas intracelularmente (Figura 13).

Un determinado antígeno de histocompatibilidad puede unirse a péptidos diferentes siempre que éstos posean uno o varios *motivos* que interactúen con zonas de la molécula cuya estructura suele estar condicionada por residuos polimórficos (Lim et al., 2003).

El dominio $\alpha 3$ se pliega para formar un bucle tipo Ig que sirve de unión a la molécula CD8. La cadena ligera $\beta 2m$ interactúa de modo no covalente con el segmento $\alpha 3$, y al igual que este se pliega en un dominio tipo Ig.

La molécula de clase I una vez completamente ensamblada forma un heterotrímero, constituido por la cadena α , la $\beta 2m$ y el péptido. En esta conformación la molécula se encuentra estable en la membrana celular.

La $\beta 2m$ es idéntica en todos los individuos de la misma especie y los genes que la codifican, a diferencia de los genes del HLA, se localizan en el cromosoma 16 en los humanos y en el cromosoma 2 en el ratón. La $\beta 2m$ pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, con una notoria homología con el tercer dominio constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Figura 12).

Salvo en las células germinales que son haploides, todo individuo normal heterocigoto expresa seis moléculas HLA de clase I clásicas diferentes en cada

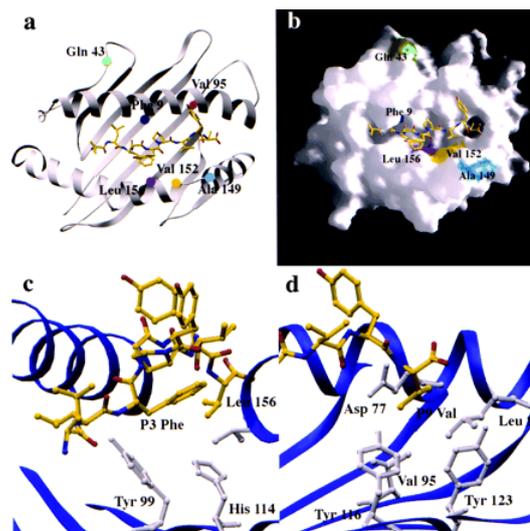


Figura 13. Acoplamiento del péptido Tax - 11 - 19 en la hendidura y posición de los residuos aminoácidos polimórficos en los subtipos de HLA-A2. (a y b) El complejo HLA-A2 - Tax11 - 19 visto desde arriba de la ranura de unión del péptido. Las posiciones de los residuos polimórficos del subtipo HLA-A2 están marcadas en el HLA. Residuo 9, de color azul oscuro; residuos 43, verde, el resto 95, rojo, residuo de 149, cian, 152 de residuos, de color amarillo, y el residuo 156 de color magenta. El péptido se muestra en amarillo. (c, d) El complejo HLA-A2 - Tax11 - 19 visto desde dentro de la ranura de unión del péptido. El péptido se muestra en amarillo y el HLA es de color azul. (c) La ubicación de los residuos polimórficos 156 en el D - bolsillo. (d) La ubicación de los residuos polimórficos 95 en la F - bolsillo (Lim et al. *J Exp Med* 2003;198:99 - 109).

célula, ya que contienen cadenas α derivadas de los seis alelos de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, tres alelos heredados de la madre y tres del padre. Estas moléculas se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleadas del organismo pero en el endotelio, las glándulas de Brunner duodenales, el trofoblasto veloso y las neuronas del sistema nervioso central cuya expresión es mínima o incluso nula.

Dentro de las moléculas HLA de clase I clásicas hay que destacar la presencia de un determinante antigénico denominado epítipo HLA-Bw4, que es compartido por ciertos antígenos HLA-A y HLA-B, y que presenta dimorfismo en la posición 80 de la α 1-hélice basado en la presencia de un aminoácido de isoleucina (Ile) o de threonina (Thr), como se muestra en la Tabla 7.

Es de reciente conocimiento la relevancia de las moléculas HLA-C debido a su relevante rol como ligando de los receptores del tipo inmunoglobulina de las células asesinas (KIR, del inglés, *Killer cell immunoglobulin-like receptor*), expresados en las células NK y en algunos subtipos de células T. Aunque las moléculas HLA-C presentan grandes homologías con las otras HLA-I clásicas, HLA-A y HLA-B, y que su hélice α 2 es muy similar a la de HLA-B, también posee diferencias importantes como es su baja expresión en membrana y su mucho más reducida diversidad alélica (Zemmour et al., 1992; Blais et al., 2011) (Tabla 7).

Es de destacar que los alelos HLA-C están estrechamente relacionados entre sí y su dominio α 1 está inusualmente conservado (Figura 14, a) y que el motivo KYRV en la hélice α 1 formado por los residuos 66, 67, 69 y 76, curiosamente, se conserva en todas los alelos HLA-C mientras que está ausente en las moléculas HLA-A y HLA-B, excepto HLA-B46. Además, una glicina conservada en el aminoácido 45 de la hélice α 1 junto con la presencia de cuatro residuos únicos en el dominio α 2 del HLA-C y la reducida diversidad en el bolsillo (Figura 14, b) del sitio de reconocimiento del antígeno son especialmente llamativas en las moléculas HLA-C y se correlacionan con su capacidad de unión a un conjunto restringido de péptidos propios en comparación con los antígenos HLA-A y HLA-B, enfatizando el peculiar carácter del HLA-C (Zemmour et al., 1992).

Tabla 7. Polimorfismo de los antígenos HLA-A, HLA-B y del locus HLA-C

HLA-A		HLA-B		HLA-C		DIMORFISMO EN POSICIÓN 80 DEL EPÍTOPO HLA-Bw4	
Serología	Serología	Serología	Alelos	Aminoácido	Antígenos		
A1	B7	Cw1	C*01:02-10	Ile80	HLA-A23, -A24, -A25, -A32, -B38, -B49, -B51, -B52, -B53, -B57, -B58, -B59, -B63		
A2	B8	Cw2	C*02:02-09	Thr80	HLA-B13, -B27, -B37, -B44, -B47		
A3	B13	Cw3	C*03:02-18				
A11	B14	Cw4	C*04:01-15				
A23 (9)	B18	Cw5	C*05:01-10				
A24 (9)	B27	Cw6	C*06:02-11				
A25 (10)	B35	Cw7	C*07:01-29				
A26 (10)	B37	Cw8	C*08:01-12				
A29 (19)	B38 (16)	-	C*12:02-15				
A30 (19)	B39 (16)	-	C*14:02-05				
A31 (19)	B40	-	C*15:02-13				
A32 (19)	B41	-	C*16:01-04				
A33 (19)	B42	-	C*17:01-03				
A34 (10)	B44 (12)	-	C*18:01-02				
A36	B45 (12)	-					
A43	B46	-					
A66 (10)	B47	-					
A68 (28)	B48	-					
A69 (28)	B49 (21)	-					
A74 (19)	B50 (21)	-					
A80	B51 (5)	-					
	B52 (5)	-					
	B53	-					
	B54 (22)	-					
	B55 (22)	-					
	B56 (22)	-					
	B57 (17)	-					
	B58 (17)	-					
	B59	-					
	B60 (40)	-					
	B61 (40)	-					
	B62 (15)	-					
	B63 (15)	-					
	B70 (15)	-					
	B71 (15)	-					
	B72 (15)	-					
	B73	-					
	B75 (15)	-					
	B78	-					
						DIMORFISMO EN POSICIÓN 80 DE HLA-C	
						Aminoácido	Alelos
						Asn80	Grupo C1: HLA-C*01, *03, *07, *08, *12, *14, *16
						Lys80	Grupo C2: HLA-C*02, *04, *05, *06, *15, *1602, *17, *18

La principal característica de las moléculas codificadas por el locus HLA-C es su escasa expresión en la superficie celular, que sólo representan ~ 10 - 35% de la expresión en membrana de los HLA-A y HLA-B. Se han propuesto varias teorías para explicar este fenómeno, entre otras la baja tasa de RNA mensajero (RNAm), la más pobre asociación a la $\beta 2m$ y su restringida capacidad de unión a los péptidos lo que lleva a la acumulación de residuos intermedios en el retículo endoplásmico (RE); recientes observaciones sugieren que existe un mecanismo a nivel post-transcripcional que impide que las moléculas HLA-C puedan ser exportadas apropiadamente a la superficie celular (Blais et al., 2011). Por otra parte, la pobre expresión en la membrana celular de estas moléculas también puede deberse a que su prolongada asociación con TAP en el RE impediría su exocitosis; de hecho, se ha demostrado que la retención de TAP es dependiente del motivo KYRV de la hélice

$\alpha 1$ del HLA-C y que este motivo podría restringir el rango de ligandos propios aceptados por la cadena pesada las moléculas de HLA-C mediante la reducción de la plasticidad de la ranura de reconocimiento del antígeno, prolongando de ese modo la interacción con TAP mientras espera para ligar el péptido 'perfecto'.

Los péptidos “propios” que contienen el motivo apropiado capaz de unirse a la mayoría de los alelos HLA-C (Pro en la posición 2 o 3 y un residuo hidrófobo de anclaje en el C - terminal) (Figura 14b) están presentes en cantidades muy pequeñas en el RE. Se ha sugerido que las moléculas HLA-C tienen una función especializada en el sistema inmunológico ya que al no saturarse con proteínas endógenas quedan libres para unirse y presentar un conjunto de péptidos virales que no están eficientemente presentados por las moléculas HLA-A y HLA-B. Consistente con esta idea, se ha propuesto también que la baja expresión de HLA-C podría desempeñar un papel en la formación del repertorio de la célula T durante la selección positiva en el timo (Blais et al., 2011).

En el locus HLA-C se ha descrito un dimorfismo en posición 80 de la $\alpha 1$ - hélice en base a la presencia de un aminoácido de asparragina (Asn) o de lisina (Lys), el cual nos permite clasificar los diferentes alelos HLA-C en dos grupos, grupo C1 y grupo C2 (Colonna et al., 1993; Mandelboim et al., 1996, Parham P 2004) (Tabla 7). Así, el grupo C1 (alelos HLA-C^{Asn80}) incluye los alelos HLA-C*01, HLA-C*03, HLA-C*07, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14 y HLA-C*16:01, mientras que el grupo C2 (alelos HLA-CLys80) comprende los alelos HLA-C*02, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*15, HLA-C*16:02, HLA-C*17 y HLA-C*18. Estudios cristalográficos han revelado que esta posición influye en las diferencias observadas en las interacciones de HLA-C con los KIR mostrando que la naturaleza del residuo 44 en la molécula de KIR (metionina en KIR2DL1/S1 y lisina en KIR2DL2/3) es crítico para la interacción con el residuo 80 de la molécula HLA-C (Winter et al., 1998).

A pesar de que la unión de KIR con los complejos de péptido/HLA-C es análoga a la unión con el receptor clonotípico de células T (TCR, del inglés, T cell receptor), las regiones de contacto son diferentes; en las interacciones HLA-C/péptido con KIR las posiciones 7 y 8 del C - terminal del HLA-C que se une

al péptido son las que entran en contacto directo con la molécula KIR, en cambio, en las interacciones de los complejos HLA-C/péptido con el TCR los residuos que entran en contacto con el TCR son el 4 - 6, situados en la región más central (Figura 14b). La localización de las zonas de interacción del HLA-C con KIR y TCR hace que sea imposible para una molécula HLA-C estar en contacto simultáneamente con una célula T y una NK.

Como se ha comentado anteriormente, las moléculas de histocompatibilidad de clase Ib o no clásicas, HLA-E, HLA-G y HLA-F, presentan una gran homología estructural con las moléculas clásicas de HLA de clase I clásicas pero presentan menor con menor polimorfismo y su expresión en las membranas celulares es variable, tanto en su distribución tisular como en la densidad en la membrana celular (Rodgers et al., 2005).

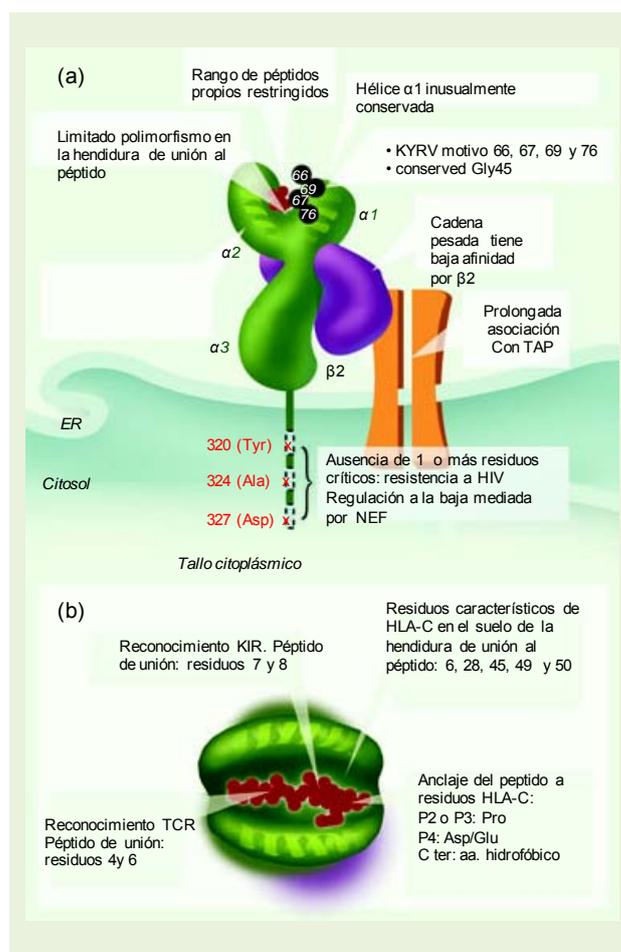


Figura 14. Características distintivas de la molécula HLA-C.

(a) Los residuos conservados se encuentran en los dominios α1 y α2, lo que implica una capacidad de unión a una gama limitada de péptidos propios. Ciertos alelos HLA-C son resistentes a regulación a la baja de la molécula HLA-C mediada por VIH Nef mediada debido a la ausencia de alguno de los tres aminoácidos clave del tallo citoplásmico (320 (Tyr), 324 (Ala), 327 (Asp)) que son críticos en la resistencia al HIV. Baja afinidad por la cadena ligera (β). El motivo KYRV en la hélice α1 formado por los residuos 66, 67, 69 y 76 que se conserva en todas los alelos HLA-C y está ausente en las moléculas HLA-A y HLA-B, excepto B46. La retención de TAP depende del motivo KYRV de la hélice α1 del HLA-C. (b) Localización de los residuos importantes en la interacción del complejo péptido (rojo) y HLA-C (verde) con la molécula KIR (residuos 7 y 8) y al TCR (posiciones 4 y 6). Los péptidos “propios” con el motivo de unión a los alelos HLA-C (Pro en la posición 2 o 3 y un residuo hidrofóbico de anclaje en el C-terminal) (Figura 14b) están presentes en cantidades muy pequeñas en el RE (adaptado de Blais et al., Immunology 2011; 133: 1 – 7)

La molécula HLA-E tiene una estructura tridimensional muy similar a la de las moléculas HLA clásicas (O'Callaghan et al., 1998) con una cadena pesada de 3 dominios que conserva la interacción con la $\beta 2m$ y la conformación del bucle de unión con CD8. Igual ocurre con la orientación del péptido dentro del surco de unión peptídica y la medida del surco que es similar a la de las moléculas clásicas (O'Callaghan et al., 1998). Aunque no hay muchos datos sobre su expresión en la membrana plasmática celular se conoce que su estabilización en la misma depende de su unión a péptidos y la $\beta 2m$.

La mayoría de péptidos que se unen a la molécula de HLA-E son péptidos de nueve aminoácidos derivados de la secuencia señal de las moléculas HLA de clase I, preferentemente de HLA-G, y esta unión es dependiente de TAP (Lee et al., 1998a; Furukawa et al., 1999). Dichos péptidos presentan una secuencia de aminoácidos muy hidrofóbica por lo que para facilitar su unión con HLA-E el surco de unión al péptido también es hidrofóbico. La presencia de esas cadenas hidrofóbicas restringe el número de péptidos que pueden unirse a HLA-E; en particular, en la posición 97, en la que en la mayoría de los alelos de clase Ia tiene una arginina (Arg) o asparragina (Asn), en la molécula HLA-E hay un triptófano que junto con la fenilalanina en posición 116, crea una envuelta hidrofóbica para interactuar con la mitad carboxilterminal del péptido (O'Callaghan et al., 1998).

La molécula HLA-E se transcribe en todos los tejidos estudiados, es decir, que todos ellos presentan niveles de RNAm detectables (Wei y Orr, 1990). A pesar de ello, debido a un control postranscripcional, su expresión en la superficie celular es débil (Lee et al., 1998a) y, curiosamente, la expresión de HLA-E ha sido detectada en la superficie celular en líneas celulares de melanoma FN55, NW145 y R22.2 (Marín et al., 2003).

Por otra parte, se ha descrito una sustitución no sinónima en la posición 107 del dominio $\alpha 2$ de la molécula de HLA-E (Tabla 8) por cuya razón los alelos HLA-E son designados como Arg (R) si el aminoácido es arginina y Gly (G) si el aminoácido es glicina, esta sustitución de aminoácido no se localiza en la región de unión al péptido HLA de clase I no clásico, sino en la región de interacción con el

TCR (Marín et al., 2003). Se ha descrito que la expresión de moléculas HLA-E está en relación con sus diferencias alélicas.

Funcionalmente, se sabe que la molécula HLA-E es el principal ligando, si no el único, del receptor inhibitor de las células NK CD94/NKG2A (Lee et al., 1998b, Long, 1998) y se han descrito diferencias funcionales entre los diferentes alelos HLA-E (R versus G) relacionados con la citotoxicidad NK ya que, la interacción de HLA-E con su ligando depende de la los péptidos presentes en la secuencia señal de las moléculas HLA-I, por lo que se puede o no lograr la inhibición de la lisis por las células NK (Maier et al., 2000).

	Dominio $\alpha 1$ Exón 2				Dominio $\alpha 2$ Exón 3	
Nucleótido	5	230	245	246	48	198
E*01:01	C	C	C	G	A	A
E*01:02	C	C	G [‡]	C	A	A
E*01:03:01	C	C	C	G	G	A
E*01:03:02	C	T [‡]	C	G	G	A
E*01:04	T [‡]	C	C	G	G	G
Aminoácido	2	77	82	83	107	157
E*01.01	Ser	Asn	Arg	Gly	Arg (R)	Arg
E*01:02	Ser	Asn	Arg	Arg	Arg (R)	Arg
E*01:03:01	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly (G)	Arg
E*01:03:02	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly (G)	Arg
E*01.04	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly (G)	Gly

‡Estos cambios no reflejan una sustitución de aminoácido.

Según Ulbrecht et al., (1999 y 2000) los niveles de expresión en superficie de HLA-E no están relacionados con su capacidad para inhibir la lisis mediada por células NK ya que esta función depende del reconocimiento diferencial del ligando HLA-E por su receptor CD94/NKG2A en las NK. Como se ha comentado anteriormente, los dos alelos más frecuentes de HLA-E se diferencian en la posición 107 pudiendo ésta estar ocupada por una glicina (HLA-E^G) o por una arginina (HLA-E^R) y, según estudios realizados con líneas transfectantes de ratón, esa simple

sustitución de aminoácidos afecta de forma importante al transporte intracelular y a la expresión en membrana de las cadenas pesadas de HLA-E. De hecho, se observó que las moléculas HLA-E^R cargadas con el péptido derivado de la secuencia señal de HLA-A2 o de HLA-G no inhibían el reconocimiento por CD94/NKG2A⁺ de la línea celular NKL (línea NK humana). Sin embargo, la unión al HLA-E^G al péptido derivado de HLA-A2 resultó ser parcialmente efectivo y la unión al péptido derivado de HLA-G resultó ser una protección efectiva. Por tanto, la función de CD94/NKG2A no depende sólo de la secuencia señal presentada sino que también depende de la variante de HLA-E presentadora (Ulbrecht et al., 1999; Matsunami et al., 2002). En resumen, podemos deducir que para el conocimiento de la función del HLA-E “*in vivo*” es necesario conocer el tipo de alelo expresado así como el haplotipo HLA de clase I.

Por otra parte, el hecho de que HLA-E ligue y presente secuencias de moléculas HLA-I clásicas, evidencia que la expresión de HLA no ha sido inhibida. Cuando presenta el péptido adecuado HLA-E se une a los receptores CD94/NKG2A que inhiben la actividad citotóxica de las NK y de ciertos linfocitos T (Lee et al., 1998b) y, por consiguiente, las células que expresan HLA-E no son destruidas por las células NK (Borrego et al., 1998). En la actualidad se ha descubierto que la proteína UL40, derivada de los citomegalovirus (CMV), es capaz de unirse a HLA-E y provocar una cascada de inhibición en las células NK (Ulbrecht et al., 2000).

Otras moléculas HLA de clase I no clásicas que no se han valorado en este trabajo pero con un importante papel inmunológico en la patología tumoral son las moléculas HLA-F y HLA-G (Chang et al., 2005; Rebmann et al., 2007). Brevemente, la molécula HLA-F se expresa principalmente en amígdalas, bazo y timo y su localización es intracelular. Se ha descrito que los tetrámeros de HLA-F se unen a los receptores ILTR2 (LIR1) y ILTR4 (LIR2) que son receptores inhibidores de leucocitos y un estudio reciente ha comunicado por primera vez que la expresión de HLA-F se asocia con una mala supervivencia, lo que sugiere su posible valor como indicador pronóstico en pacientes con cáncer de células no microcítico y que la expresión de HLA-F podría tener relevancia clínica ya que este hecho sugiere su posible valor como valor pronóstico en pacientes con tumores (Lin et al., 2011).

La molécula HLA-G se caracteriza por un limitado polimorfismo y una distribución celular y tisular restringida al trofoblasto fetal y a las células del epitelio tímico. Esta molécula puede presentarse en siete isoformas distintas generadas por splicing alternativo, cuatro de ellas son proteínas unidas a membrana (HLA-G1, G2, G3 y G4) y las otras tres isoformas son proteínas solubles (HLA-G5, G6 y G7). Una característica notable de HLA-G es que se expresa en las células del trofoblasto fetal que invaden el endometrio materno durante la formación de la placenta (Wei y Orr, 1990). Aunque la función precisa *in vivo* de HLA-G en la placenta se desconoce hay ciertas evidencias que sugieren que desempeña un papel en la tolerancia materna al feto por medio del control de la acción de las células NK, los linfocitos T, los macrófagos y las células mielomonocíticas (Shiroishi et al., 2003) gracias a su interacción con un grupo de receptores inhibidores que también pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas (Igs) conocidos como como ILT (del inglés, *immunoglobulin like transcripts*) o como LIR (del inglés, *leukocyte Ig-like receptor*) y como KIR2DL4 (Gómez - Lozano et al., 2003). El receptor LILRB-2 (del inglés, *leukocyte immunoglobulin - like receptors 2*) también conocido como ILT4 o CD85d se expresa fundamentalmente en la superficie de las células mielomonocíticas mientras que el receptor LILRB-1 (del inglés, *leukocyte immunoglobulin-like receptors 1*) también conocido como ILT2 o CD85j, se expresa en una gama más amplia de células del sistema inmunitario, incluyendo algunas subpoblaciones de células NK y de linfocitos T. Los ILT interactúan con el dominio $\alpha 3$ de múltiples moléculas HLA de clase I clásicas y no clásicas pero, curiosamente, tanto LILRB - 1 y LILRB - 2 se unen a HLA-G con mayor afinidad que a las moléculas HLA clásicas, lo que sugiere que las diferencias en la estructura del dominio $\alpha 3$ podrían ser importantes. Además, las moléculas ILT poseen en su tallo citoplasmático un motivo inhibidor de tirosina (ITIM, del inglés, *immunoreceptor tyrosine - based inhibitory motif*) que inhibe la respuesta celular por reclutamiento de fosfatasa, lo que sugiere que el reconocimiento ILT/HLA-G puede jugar papel relevante en la regulación de la activación de las células NK, de las células T y de las células mielomonocíticas (Shiroishi et al., 2003).

Por otra parte, HLA-G parece participar en la vigilancia del sistema inmunitario frente a tumores e infecciones virales y, se ha descubierto un aumento en

el nivel de la expresión de esta molécula en la superficie de las células infectadas por el HIV, lo que podría ser una estrategia del virus para escapar de su destrucción por el sistema inmunitario (Shiroishi et al., 2003).

6.2. Moléculas HLA de clase II

Los genes que codifican las moléculas HLA de clase II se localizan en la región D del cromosoma 6 que, a su vez, se subdivide en tres subregiones: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (Mónaco, 1993). Las moléculas HLA de clase II son también glicoproteínas formadas por dos cadenas, ambas con un dominio transmembrana, denominadas cadena α o pesada y cadena β o ligera, asociadas entre sí mediante interacciones de naturaleza no covalente. A diferencia de las moléculas de clase I, ambas cadenas son sintetizadas por genes del HLA. La designación de sus loci en el cromosoma 6 consisten en 3 letras: la primera (D) indica la clase, la segunda (M, O, P, Q o R) la familia y la tercera (A o B) la cadena (α o β , respectivamente). Los genes individuales son diferenciados por números arábigos y la anotación para la variante alélica de estos genes es un número precedido de un asterisco. Por ejemplo, HLA-DRB1*0401 nomina a la variante alélica 0401 del gen 1 que codifica la cadena β de la molécula de clase II que pertenece a la familia R.

La cadena α tiene un peso molecular aproximado de 31 - 35 kD y la cadena β de 27 - 30 kD. La cadena α y la cadena β tienen una organización semejante y poseen segmentos que se nombran desde su extremo N - terminal como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$ (Figura 15). Cada uno de estos dominios consta de 90-96 aminoácidos. El dominio $\alpha 1$ es abierto mientras que los dominios $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ se pliegan cada uno de ellos mediante un puente disulfuro. Cuando se analizan los aminoácidos de las cadenas se observa que los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, mientras que los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, que son los que presentan mayor diversidad, presentan homología con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de los antígenos clase I (Figuras 12 y 15). Un tercer dominio corresponde a la región de cada cadena que atraviesa la membrana celular (dominio transmembrana) contiene unos 30 aminoácidos y es de naturaleza hidrofóbica. Finalmente, el cuarto dominio,

corresponde a la parte citoplasmática de la molécula, es también de naturaleza hidrofílica y contiene de 10 a 16 aminoácidos.

En esta molécula los sitios de unión al péptido se encuentran entre los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$ y el espacio que surge de esta relación de dos cadenas polipeptídicas distintas es mayor que el que forman los segmentos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del HLA-I, por ello los péptidos antigénicos que se unen al HLA-II pueden ser algo mayores que los que se unen a los de HLA de clase I, y llegan a poseer entre 10 a 30 aminoácidos o incluso más (Figura 15).

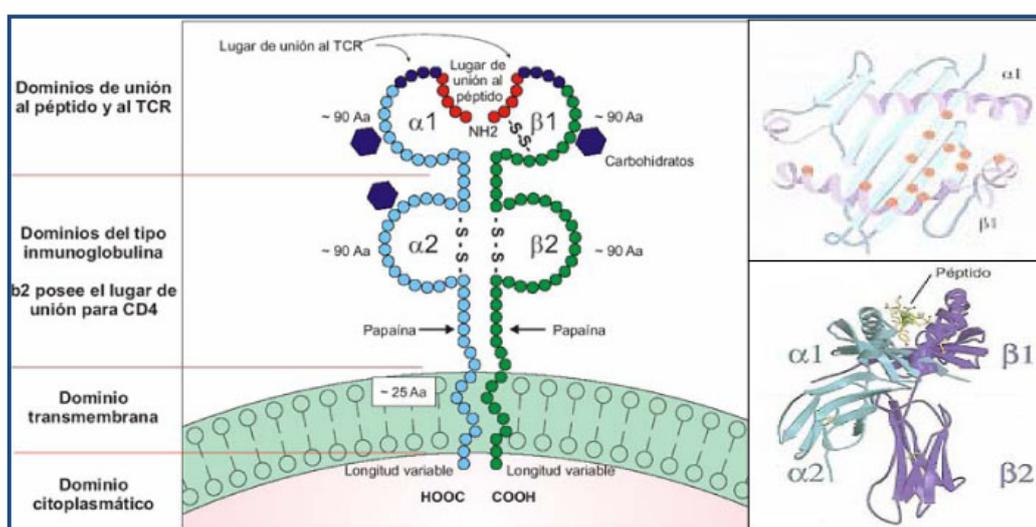


Figura 15. Estructura de las moléculas HLA de clase II. Las moléculas de Clase II tienen dos cadenas α y β , cada una de ellas posee un dominio extracelular ($\alpha 1$ y $\beta 1$, respectivamente) que conforman la hendidura donde se acopla el péptido, un dominio extracelular tipo inmunoglobulinas ($\alpha 2$ y $\beta 2$, respectivamente), una región transmembrana y un tallo citoplasmático.

Las secuencias polimórficas de las moléculas de clase II se ubican alrededor de los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$ e inclusive entre ambos, pero se ha demostrado que existe mayor polimorfismo en los dominios $\beta 1$. En tanto que los segmentos $\alpha 2$ y $\beta 2$ se pliegan formando dominios tipo Ig, los bucles formados por las secuencias $\beta 2$ son el sitio de unión a la molécula CD4 de los linfocitos T colaboradores.

En similitud con las moléculas HLA de clase I, las de HLA-II completamente ensambladas y estables forman heterotrimeros, constituidos por la cadena α , la cadena β y el péptido.

En un individuo normal heterocigoto existen seis alelos para la cadena α y seis para la cadena β , lo que nos daría como resultado un total de doce posibles variantes moleculares HLA-II. Sin embargo, existen cadenas α provenientes del alelo HLA-DQ α que no necesariamente se aparean con las cadenas β del alelo HLA-DQ β , si no que pueden asociarse a cadenas β de otros alelos (HLA-DP β , HLA-DR β , etc.) y este mecanismo permite la existencia de alrededor de 10 a 20 moléculas de clase II.

7. HLA Y ENFERMEDAD

El descubrimiento de asociaciones entre ciertas enfermedades y HLA representa uno de los avances más importantes en la medicina clínica y que ha proporcionado un fundamento firme para entender la etiología de la enfermedad (Trowsdale, 2011).

Las patologías más dramáticas asociadas al mal funcionamiento HLA aparecen por defectos en los genes que codifican para estas moléculas o en los genes que influyen su expresión en las células lo que genera un defecto en la expresión celular de estas moléculas que clínicamente se manifiesta como una inmunodeficiencia primaria severa causada por déficit de HLA-I, de HLA-II o de ambas como en el Síndrome de linfocito desnudo de tipo I, tipo II o tipo III, respectivamente (Raghavan, 1999; M. DeSandro et al., 1999).

Otro gran grupo de enfermedades involucran a genes situados en la región HLA que van asociados con determinados alelos de clase I o II o con algunos haplotipos concretos. Entre ellas son buen ejemplo la narcolepsia (Nishino et al., 2000), la susceptibilidad a padecer ciertas infecciones como malaria (Hill et al., 1992; Hill et al., 1997), el riesgo incrementado para padecer ciertas enfermedades autoinmunes como la espondilitis anquilosante (EA) (Feltkamp et al., 1997), una posible predisposición a tumores (Möller et al., 1992; Méndez et al., 2009), desarrollo de inmunotolerancia en trasplantes (Colvin, 1990) y respuestas diversas frente a la inmunoterapia (Yee et al., 1997; Collins et al., 1998).

Cuando estas asociaciones tienen un valor estadísticamente significativo se suelen considerar como factores de susceptibilidad o marcadores de riesgo a padecer

la enfermedad, que da una idea de la mayor o menor probabilidad que tiene un individuo para padecer una determinada enfermedad si es portador de dicho alelo HLA con respecto a aquellos individuos que no lo portan.

A pesar del gran polimorfismo de las moléculas HLA y de la constante ampliación del número de subtipos alélicos de clase I y de clase II, hoy se conocen múltiples enfermedades que están asociadas a HLA de clase I y otras a clase II pero, el número de enfermedades asociadas a alelos HLA de clase I es menor que el de las asociadas a clase II. Aunque hay numerosos estudios sobre este aspecto, aún no se conocen bien las causas de esta asociación HLA y enfermedad. Por ejemplo en la EA, una enfermedad invalidante que afecta a las articulaciones de la columna principalmente, se ha descrito una fuerte asociación con HLA-B27 y se ha podido observar que, ciertos péptidos antigénicos de origen articular serían capaces de formar específicamente un complejo con HLA-B27 que induciría fenómenos de autoinmunidad, bien por generar en la molécula HLA-B27 modificaciones conformacionales que la harían no reconocible como propia, bien por generar complejos HLA-péptido con cierta similitud con antígenos bacterianos que provocarían reacciones cruzadas autoagresivas en individuos HLA-B27, previamente sensibilizados a tales antígenos bacterianos (Taurog, 2010). En el caso de la diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID), enfermedad que cursa con una destrucción selectiva de los islotes de Langerhans del páncreas y con infiltración linfocitaria, se considera que puede resultar de una respuesta autoagresiva mediada por linfocitos T reactivos frente a antígenos presentes en la membrana las células de los islotes (Wen et al., 2000). También es bien conocida la asociación de HLA-C6 con psoriasis y también con otras enfermedades severas de la piel. Igualmente se ha descrito la susceptibilidad de HLA-C6 con artritis psoriásica aunque esta asociación es menos fuerte que en la psoriasis.

Hasta la fecha, las evidencias respecto al papel del sistema HLA en la susceptibilidad al melanoma, así como al pronóstico de la misma, son contradictorias. En este sentido, estudios serológicos iniciales identificaron un incremento de los antígenos HLA-A9 (Cavelier et al., 1980; Rovini et al., 1988) y HLA-B13 (Muto et al., 1996) en pacientes con melanoma, el primero de los cuales se

asoció principalmente con las formas metastásicas o recidivantes de la enfermedad y también se describió asociación de la expresión de HLA-B51 en pacientes con melanoma acral, antígeno que no expresaba en ningún paciente con melanoma nodular de su serie. Por otro lado, también se ha descrito una asociación negativa del melanoma con los antígenos HLA-B61 (Muto et al., 1996), pero en un estudio realizado por Kageshita et al. no se evidenció asociación negativa entre los antígenos HLA de clase I y el melanoma (Kageshita et al., 1996).

Otros autores han correlacionado ciertos alelos HLA de clase I como el HLA A11 y HLA A19 a una mejor respuesta a la inmunoterapia con IL-2 o con linfocitos infiltrantes del tumor (TIL, del inglés, *Tumour - infiltrating lymphocytes*) (Marincola et al., 1992). Sin embargo, estudios de otros grupos no confirman las asociaciones HLA antes descritas con el incremento de la susceptibilidad a desarrollar melanoma o tener peor pronóstico (Kageshita et al., 1997; Lulli et al., 1998; Lombardi et al., 1998; Nagore et al., 2002; Luongo et al., 2004). Respecto al papel de los locus HLA-C y HLA-E, existe un número limitado de estudios sobre el papel de HLA-C en la susceptibilidad y/o pronóstico del melanoma (Rovini et al., 1988; Mueller-Eckhardt et al., 1984; Muto et al., 1996) y algunos de ellos son contradictorios.

Por último, se ha encontrado un aumento en la frecuencia de alelos HLA de clase II, como HLA-DR4 en pacientes caucásicos con mayor riesgo de melanoma desarrollar melanoma (Barger et al., 1982) y HLA-DR5 en pacientes con MES (Mueller-Eckhardt et al., 1984). Además, el alelo HLA-DQB1*0303 ha sido asociado con mayor susceptibilidad a MM, mientras que el alelo HLA-DQB1*0301 se ha asociado tanto a la mayor susceptibilidad a metástasis y a peor pronóstico (Bateman et al., 1998; Lee et al., 1994), y el alelo HLA-DRB1*1101 se le ha asociado a riesgo de recurrencia (Lee et al., 2002, 1994; Lee et al., 1996). Por otra parte el estudio de Barger (1982) también observaron que HLA DR3 podría ser un factor genético asociado a larga supervivencia en pacientes con melanoma.

Sin embargo, como los datos sobre polimorfismo HLA y su posible asociación con susceptibilidad y/o pronóstico del melanoma cutáneo todavía son controvertidos, es razonable realizar estudios con cohortes más amplias que aporten

datos sobre la posible asociación de los antígenos HLA y el melanoma. Por eso, el presente trabajo fue planteado con el objeto de volver a investigar la posible influencia del HLA de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y del HLA de clase II (HLA-DR y HLA-DQ) en una población de pacientes con melanoma cutáneo de la Región de Murcia en el sureste de España.

8. BIOLOGÍA DE LA CÉLULA DE MELANOMA E INTERACCIÓN CON EL HUÉSPED

La etiopatogenia de la enfermedad tumoral constituye un proceso biológico complejo y prolongado en el tiempo, que se caracteriza por una acumulación de alteraciones genéticas en los sistemas moleculares que regulan la activación y proliferación de las células que sufren la transformación neoplásica. La célula transformada acumula alteraciones genéticas que le confieren una descontrolada e intensa capacidad de proliferación. Estas modificaciones genéticas también conllevan la síntesis de nuevas proteínas potencialmente reconocibles por el sistema inmunitario, denominadas antígenos asociados al tumor. No obstante, en la expansión de las células tumorales, que incluye su crecimiento local y su diseminación sistémica, también participan diversos mecanismos del huésped que pueden favorecerlo o suprimirlo (Álvarez-Mon et al., 2005).

Desde un punto de vista clínico, la intervención del sistema inmunitario en la lucha contra el melanoma se ha apoyado en observaciones como los fenómenos de regresión tumoral (Fontaine et al., 2003), la posibilidad de un prolongado intervalo libre de enfermedad entre la exéresis del tumor primario y el eventual desarrollo de metástasis (Leong et al., 2005), la existencia de respuestas parciales o completas en pacientes que han recibido inmunoterapia (Strohal et al., 1994), o el incremento de 2 a 5 veces en la tasa de incidencia de melanoma en pacientes trasplantados en tratamiento con inmunosupresión terapéutica (Le Mire et al., 2006, Engels et al., 2011).

Desde un punto de vista biológico, se han detectado linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos asociados al tumor tanto en la sangre periférica de pacientes

con melanoma como en los nódulos linfáticos metastásicos (Mihm et al., 1996; Lee et al., 1999; Palermo et al., 2001; Oijen et al., 2004).

Por todo lo expuesto, el melanoma es considerado uno de los tumores más inmunogénicos. No obstante, a pesar de la inducción de la inmunidad específica del tumor que ocurre en un gran número de pacientes, las remisiones espontáneas son extremadamente raras.

9. RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA EL MELANOMA

La expresión de antígenos asociados a la transformación tumoral de los melanocitos se relaciona con la infiltración peritumoral de células accesorias, linfocitos T y B y células citotóxicas naturales (NK, del inglés, *natural killer*), cuya acción frente al melanoma comienza con el reconocimiento de dichos antígenos (Oble et al., 2009).

Diversos resultados experimentales y hallazgos clínicos indican que la respuesta inmunitaria constituye un mecanismo muy importante en el control de la proliferación de las células del melanoma, así como de su diseminación hematogena y anidación metastásica (Figura 16). Igualmente, se ha comprobado que los pacientes con melanoma presentan deficiencias funcionales en diversas subpoblaciones linfocitarias, que podrían derivar en tolerancia tumoral. Así, se han descrito alteraciones en la producción de citoquinas por los linfocitos T implicadas en la activación de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK (Lee et al., 2004), y se han comprobado defectos en la capacidad lítica de las células efectoras citotóxicas (Jovic et al., 2001). A pesar de la participación de diferentes componentes de la respuesta inmunitaria humoral y celular en la eliminación de las células tumorales, aunque parezca paradójico, la inmunidad tumoral frecuentemente coexiste con la progresión del tumor (Jiang et al., 2007).

Las vías del sistema inmunitario adaptativo e innato pueden reconocer y responder a los tumores en desarrollo. Sin embargo, el microambiente del tumor frecuentemente suprime las respuestas antitumorales y la inflamación puede incluso promover el crecimiento del tumor y las metástasis. En este sentido, podría ser

interesante reconsiderar ciertas observaciones formuladas en décadas pasadas antes de que la medicina moderna estableciera los regímenes de tratamiento oncológico actuales.

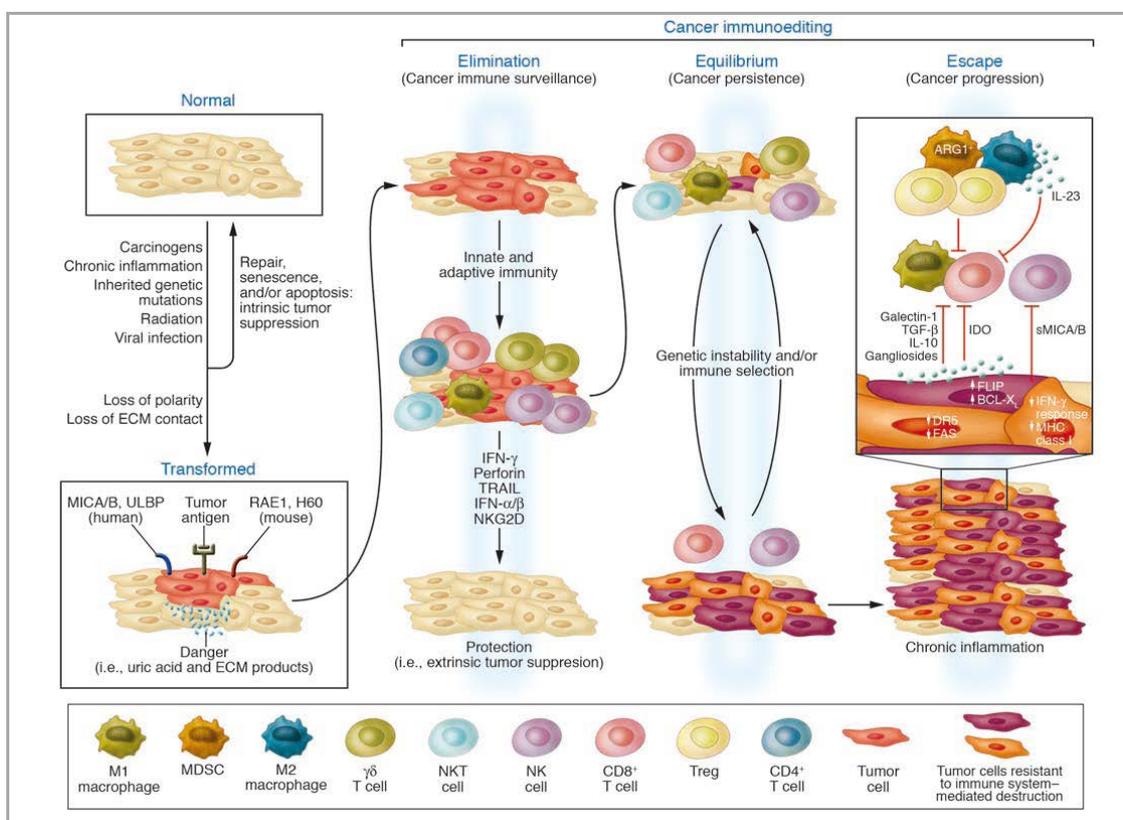


Figura 16. Inmuno-edición del cáncer. Eliminación tumoral. Las células transformadas que escapan del control intrínseco se ven sometidas a mecanismos antitumorales extrínsecos que permiten detectar y eliminar el desarrollo de los tumores. El desarrollo del cáncer desde el punto de vista inmunológico consta de tres fases: **Eliminación** (Elimination), **Equilibrio** (Equilibrium) y **Escape** (Escape). En la fase de **eliminación**, conocida como vigilancia inmunológica, la inmunidad innata y adaptativa activa mecanismos para reconocer y eliminar las células transformadas donde participan activamente las células NK y los linfocitos T; la fase de **equilibrio** aparece cuando las células tumorales tienen baja inmunogenicidad y/o son resistentes al ataque inmunológico por lo que no son eliminadas y el tumor entra en la fase de latencia a pesar de que la fase de eliminación continúa a través de la presión de selección inmune; por último, la fase de **escape** tumoral aparece porque las células tumorales ejercen mecanismos inmunosupresores que les permite burlar la inmunovigilancia e impedir la respuesta antitumoral del sistema inmunológico. Adaptado de Swann and Smyth. J. Clin. Invest. 2007; 117: 1137–1146

El sistema inmunitario humano se comporta mejor cuando se enfrenta a su más antiguo adversario, la infección microbiana. Si el sistema inmunitario pudiera ser engañado tratando un determinado tumor como si fuera una infección, las perspectivas para la supervivencia podrían mejorar en gran medida. De hecho, tal vez una estrategia basada en la toxina de Coley no sea tan obsoleta y bárbara como en un

principio pudiera parecer ya que se ha observado que esta terapia o terapias similares crean un microambiente ideal para desencadenar potentes respuestas antitumorales de la inmunidad adaptativa (Sengupta et al., 2010).

9.1. Respuesta inmunitaria mediada por células NK

Las células NK se descubrieron hace más de 30 años y se definieron como linfocitos grandes granulares pertenecientes al sistema inmunitario innato e involucradas en mecanismos tempranos de defensa tanto contra células autólogas como células alogénicas sometidas a ciertas formas de estrés, tales como las infecciones víricas, bacterianas, parasitarias o la transformación maligna. Actúan eliminando directamente a sus células diana o produciendo una gran cantidad de citoquinas o quimioquinas. Estos factores solubles participan en el inicio de la respuesta inmunitaria específica de antígeno por lo que las células NK representan un puente importante entre la inmunidad innata y adaptativa.

Aunque las células NK no expresan los receptores de antígenos clásicos de la familia de las inmunoglobulinas, como son el TCR de las células T o las inmunoglobulinas de las células B, sí están equipadas de un grupo de receptores que les permiten reconocer, discriminar y actuar sobre sus posibles dianas. En efecto, la homeostasis y función de estas células está regulada por una serie de receptores que emiten señales activadoras e inhibitoras, entre los que tenemos los receptores KIR, los receptores de células citotóxicas de la familia de las lectinas (KLR, del inglés, *killer lectin-like receptors*) y los receptores citotóxicos naturales (NCR, del inglés, *natural cytotoxicity receptors*) NKp46, NKp30, y NKp44.23. La mayoría de estos receptores son específicos de las células NK pero algunos de ellos están presentes en otras células hematopoyéticas, particularmente en los linfocitos T (Lanier et al., 2003; Tomasello et al. 2000; Vivier et al 2004).

Por otra parte, a diferencia de los linfocitos T o B del sistema inmunitario específico de antígeno o adaptativo, la conformación de la línea germinal de las células NK no conlleva reordenamientos genéticos como los que presentan los genes del receptor de las células T (TCR) o los de las inmunoglobulinas (Igs). Gracias a las investigaciones de las últimas décadas se ha conocido que las células NK tienen

multitud de receptores inhibidores y activadores, capaces de reconocer moléculas HLA de clase I, moléculas semejantes a HLA de clase I y moléculas no relacionadas con el HLA.

Por otro lado, es conocido que las células NK pueden matar células diana de forma “natural”, es decir, espontáneamente y sin requerir reconocimientos o entrenamientos previos (*priming*) y sin restricciones por la expresión de HLA en las células diana (Herberman et al., 1986). De aquí nació la hipótesis de la “pérdida de lo propio”, en inglés, “*missing self*”, (Ljunggren et al., 1990). Esta idea se desarrolló incluso antes de que se conocieran los mecanismos que poseen las células NK para “ver” sus dianas.

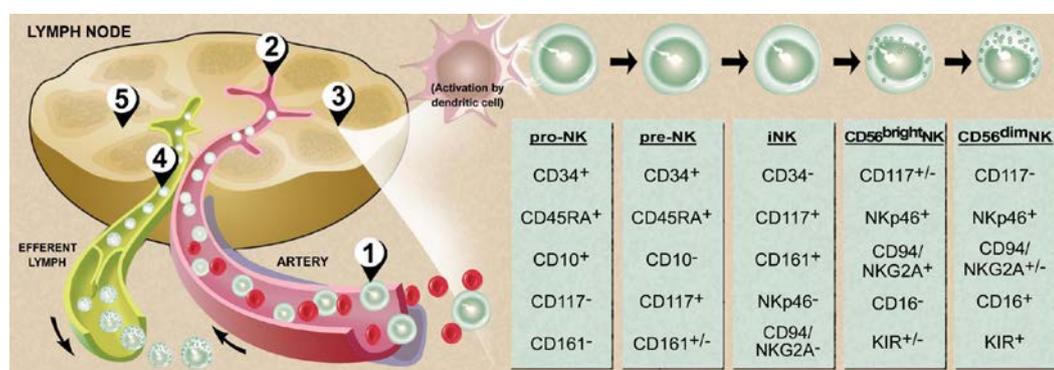


Figura 17. Modelo de desarrollo de las células NK. (1) Células hematopoyéticas de médula ósea CD34⁺CD45RA⁺ HPC circulan hacia la sangre y (2) se extravasan a través de los nódulos linfáticos de las vénulas del endotelio alto y entran al espacio parafolicular. Aquí, (3) las células pro-NK son activadas y progresan a través de diferentes estadios de maduración (tabla a la derecha) para crear tanto células NK con alta expresión de CD56 (CD56^{bright}) como células NK de baja expresión de CD56 (CD56^{dim}). (4) Las células NK CD56^{dim} en maduración retornan a la circulación por los linfáticos eferentes mientras que (5) algunas células NK CD56^{bright} se quedan en el tejido linfático secundario interactuando con las células dendríticas (DC, del inglés, dendritic cells). Illustration by Debra T. Dartez (Caliguri, 2008)

Respecto a su origen, está claro que las células NK derivan de células progenitoras del sistema hematopoyético (HPC, del inglés, *Haematopoietic progenitor cells*) de la médula ósea, pero no se conoce bien el lugar o lugares de maduración de las mismas y los detalles de este proceso. Es bien sabido que las células T se desarrollan en timo y las células B en médula ósea y que en sus respectivos lugares de desarrollo podemos encontrar “in situ” células en estadios intermedios de maduración, por el contrario, no se ha logrado aislar células NK en diferentes estadios de maduración ni en timo ni en médula ósea. Se ha sugerido que las células NK “in vivo” derivan del

tejido linfóide secundario (SLT, del inglés, *secondary lymphoid tissues*) (Figura 17), (Freud et al., 2006, Caliguri, 2008).

Las células NK tienen una vida relativamente corta, representan el 10 - 15% de todos los linfocitos de sangre periférica, y fenotípicamente se definen por la ausencia de expresión de CD3 (Robertson et al., 1990) lo cual las diferencia de los linfocitos T y del CD19 lo que las distingue de los linfocitos B (Lanier et al., 1989), y por la expresión del antígeno CD56, que es la isoforma de 140 kDa de la molécula de adhesión neural (NCAM) presente en células NK y linfocitos T. Como hemos señalado anteriormente, las células NK tienen función citotóxica y capacidad para producir citoquinas proinflamatorias. Al contrario que en humanos, las células NK de ratón no expresan CD56 pero expresan NKp46, un marcador de la familia de los NCR, altamente conservado, que se ha propuesto como el mejor marcador de células NK entre especies (Walzer et al., 2007). NKp46 se ha detectado también en una pequeña población de linfocitos T citotóxicos mientras que algunas células NK CD56⁺CD3⁻ expresan poco o nada NKp46. En resumen, hasta el momento la definición fenotípica de las células NK se hace por la expresión de una combinación única de antígenos de superficie no restringida a células NK.

Desde muy temprano se identificaron dos subclases de células NK sobre la base de la densidad de expresión de la molécula CD56; a saber, las células NK con alta expresión de CD56 (CD56^{bright}) y las células NK de baja expresión de CD56 (CD56^{dim}) (Figuras 17, 18 y 19). No obstante, algunos autores han descrito la existencia de una tercera subpoblación de células NK agranulares, escasamente representada en la sangre periférica de adultos y con fenotipo CD56⁻/CD16⁺ (Lanier et al., 1986a; Lanier et al., 1986b; Björkström et al., 2010) que podría estar involucrada en las respuestas antivirales.

Al igual que las células T, la población de células NK CD3⁻56⁺NKp46⁺ es fenotípica y funcionalmente heterogénea (Cooley et al., 2007). Aproximadamente el 10% de las células NK presentes en la sangre y cerca del 100% de las células NK del SLT son CD56^{bright} y producen gran cantidad de citoquinas y quimioquinas (Cooper et al., 2001a) a los minutos de su activación pero estas células CD56^{bright} tienen poca o ninguna capacidad citotóxica (Figura 18). Por el contrario, dentro de las células NK

circulantes el 90% expresan la molécula CD56 con una baja densidad (CD56^{dim}) y altos niveles de CD16 y una minoría de ellas, <10%, son CD56^{bright} y CD16^{dim/-}. Aunque el significado funcional de la molécula CD56 sobre células NK es desconocido, su intensidad de expresión se correlaciona con la expresión de otros marcadores de superficie que les confiere unas propiedades funcionales únicas a ambas subclases (Cooper et al., 2001b). Las células NK CD56^{dim} son altamente citotóxicas (Figuras 18 y 19) y junto con los linfocitos T contribuyen a la respuesta inmunitaria antitumoral y a la destrucción de las células tumorales, vía NCR, sin sensibilización previa y sin requerimiento de restricción vía HLA (Park et al., 2003; Wu et al., 2003; Terabe et al., 2008; Zhang et al., 2012), o también a través de un mecanismo de citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC, del inglés, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), lo cual requiere la estimulación específica previa de clones de linfocitos B y su posterior diferenciación a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas específicas de antígenos tumorales (Cooper et al., 2001; Farag et al., 2006).

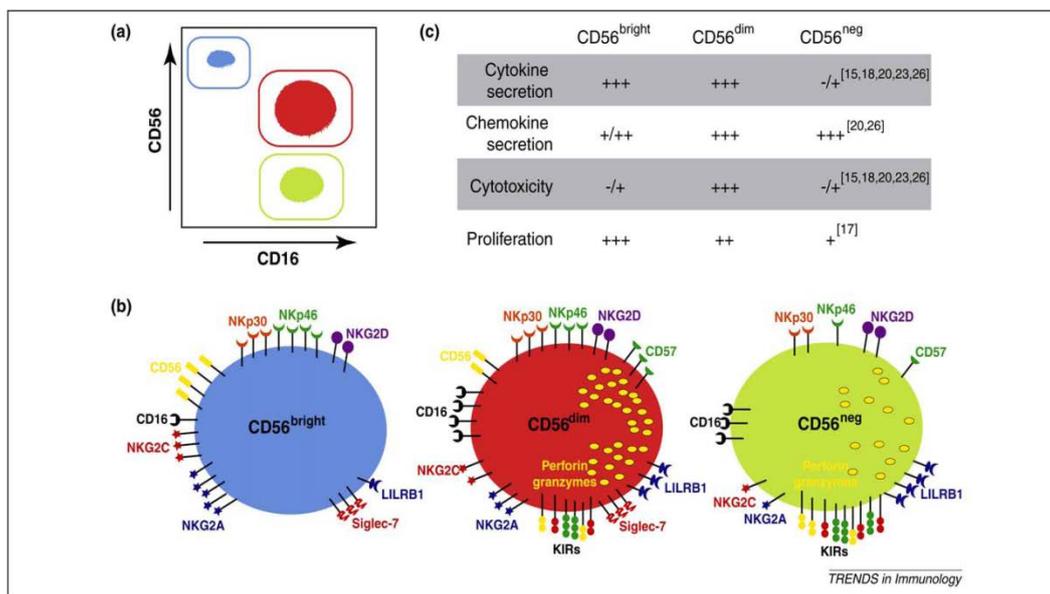


Figura 18. Propiedades fenotípicas y funcionales de las células NK CD56^{bright}, CD56^{dim} y CD56^{neg}. (a) Ilustración esquemática del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD56 y CD16 previa selección de la población linfoide con fenotipo CD3⁺CD4⁺CD14⁺CD19⁻: (azul), NK CD56^{bright}, (rojo) NK CD56^{dim} y (verde) NK CD56^{neg}. (b) Niveles de expresión de receptores de activación e inhibición en células NK de sangre periférica: (azul), NK CD56^{bright}, (rojo) NK CD56^{dim} y (verde) NK CD56^{neg}. (c) Tabla descriptiva de las funciones de las células NK de sangre periférica NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim} y NK CD56^{neg}. (Björkström et al., Trends Immunol. 2010; 31(11):401 – 6).

La actividad citotóxica sobre las células diana es un proceso escalonado que requiere la adhesión de la célula NK con su diana, la formación de la sinapsis, la polarización de los gránulos citolíticos hacia las dianas y la exocitosis de los mismos (Orange J., 2008). Dicha actividad citotóxica es controlada por el balance entre señales de activación e inhibición mediadas por diferentes receptores (McQueen and Parham 2002; Long 1999), algunos de los cuales se unen a moléculas HLA-I sobre las células diana (Borrego et al., 2002; Long et al, 2002; Held et al., 2003; Carrega et al, 2009; Held et al., 2011). En este contexto hay que destacar que los receptores KIR y la familia de receptores asociados a células NK (NKR, del inglés *Natural Killer Cell Receptors*) mejor conocida, se expresa en la superficie de la subclase de células NK CD56^{dim} y, a diferencia de ellos, los receptores KLR de tipo-C o lectina como los heterodímeros CD94/NKG2 se expresan principalmente en la subclase de células NK CD56^{bright} (Figura 19).

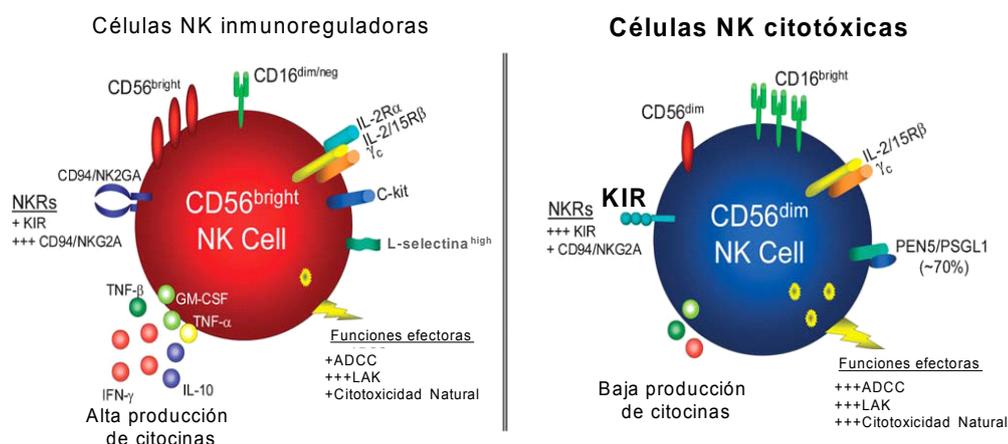


Figura 19. Subclases de células NK humanas en base a la expresión de la molécula CD56. Las células CD56^{bright} son predominantemente inmunoreguladoras que producen grandes cantidades de citoquinas. Esta subclase presenta una baja expresión de CD16 y una citotoxicidad natural y ADCC también bajas. Por el contrario, las células CD56^{dim} son esencialmente efectoras citotóxicas y expresan receptores KIR capaces de modular su función. (Adaptado de Cooper et al. *Blood* 2001;97:3146-3151)

Las células NK están implicadas en la respuesta inmunitaria antitumoral innata no específica contra el melanoma (Waldhauer et al., 2008) y además son efectores citotóxicos que participan en el control de la diseminación metastásica de la enfermedad (Nasca et al., 1999; Jovic et al., 2001) a través de un mecanismo que es

dependiente de perforina. En este sentido, se ha descrito la existencia de una disfunción de las células NK en pacientes con melanoma que han desarrollado metástasis (Jovic et al., 2001; Richards et al. 2006), apuntando a la necesidad de conocer los diferentes mecanismos implicados en la inmunosupresión asociada con el desarrollo de los estadios avanzados de la enfermedad.

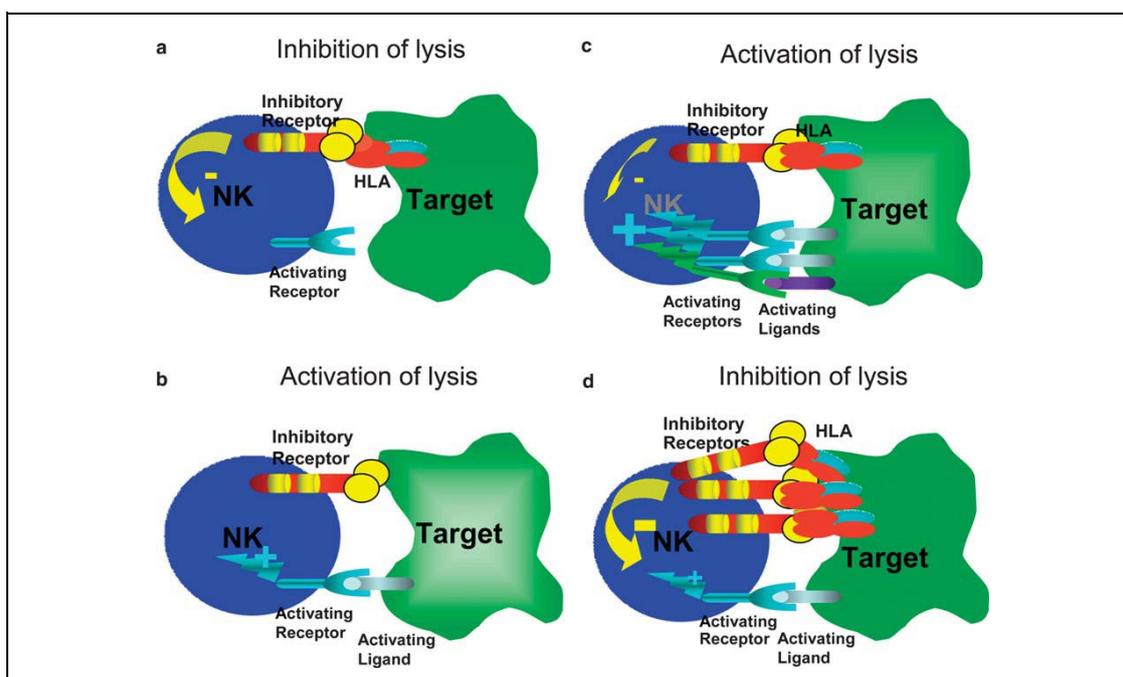


Figura 20. Regulación de la respuesta de las células NK mediante el balance de señales de activación e inhibición. La respuesta de las células NK está regulada por un equilibrio de señales de receptores activadores e inhibitorios. (a) En ausencia de una interacción entre el receptor activador/ligando, la lisis se inhibe cuando los receptores inhibitorios (KIR) reconocen e interactúan con moléculas HLA de clase I en la superficie de la célula diana. (b) La lisis se produce cuando los receptores activadores interactúan con sus ligandos en las células diana en ausencia de las señales inhibitorias producidas por las interacciones entre KIR / ligando HLA de clase I. (c) Las señales activadoras a través de las interacciones receptor activador/ligando predominan sobre las señales inhibitorias débiles inducidas en las células NK al interactuar con sus dianas, esto puede ser debido a una sobreexpresión de los receptores activadores y sus ligandos lo que resulta en una señal neta de activación al ser estas más fuertes que las señales inhibitorias. (d) En presencia de señales activadoras, el predominio de las señales inhibitorias a través de las interacciones específicas receptor / ligando dan lugar a una señal neta negativa que impide la lisis de las células diana por las células NK. (Adaptado de, Farag SS et al, Blood 2002; 100:1935 - 1947).

9.2. Respuesta inmunitaria mediada por células T

La inmunidad celular juega un papel muy importante en la respuesta antitumoral. Generalmente esta respuesta depende de la actividad de las células T

citotóxicas CD8⁺ (CTL, del inglés, *cytotoxic T lymphocyte*) cuya activación depende de la apropiada presentación antigénica mediada por los antígenos HLA de clase I. Las interacciones de los repertorios de las células T con las moléculas de superficie del polimórfico sistema HLA, conforman un sistema de vigilancia sobre todas las células nucleadas del organismo y detectan las células malfuncionantes o alteradas. El proceso clásico de esta vía involucra a múltiples componentes de la maquinaria de procesamiento de antígeno incluyendo los proteosomas y el bombeo de péptidos via TAP. Los factores que impiden el correcto funcionamiento de esta vía se inducen generalmente en infecciones virales crónicas y su presencia es común en el cáncer por lo que, consecuentemente, se les considera factores implicados en la evasión de la vigilancia por los CTL. La importancia de esta vía en el melanoma se ha ilustrado claramente en dos artículos recientes en los que se ha demostrado el progreso de metástasis en los casos en los que falló la restauración de la expresión de HLA-I durante la inmunoterapia, mientras que todas las lesiones metastásicas que regresaban expresaban un HLA-I residual (Carretero et al.2008; Cabrera et al.2007).

Los CTL son capaces de reconocer diferentes categorías de antígenos tumorales algunos de los cuales se recogen en la Tabla 9 y, entre ellos, hace pocos años se ha descrito una población capaz de reconocer tumores con HLA-I^{lo}. Curiosamente, estas CTL eliminan preferentemente tumores con defectos en la vía de procesamiento antigénico y tienen como diana una nueva categoría de antígenos tumorales que contienen epítomos designados por algunos autores como “epítomos” para células T asociados con defectos en el procesamiento de péptidos (TEIPP, del inglés, *T - cell epitopes associated with impaired peptide processing*) (Oliveira et al., 2010; van Hall et al., 2006).

Desde hace años se conoce la existencia de inmunidad mediada por CTL dirigida contra antígenos asociados a melanoma en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* (Ramírez - Montagut el al. 2003). Gracias a los avances tecnológicos, en los últimos años se han identificado y caracterizado muchos antígenos asociados a melanoma que pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y son restringidos por HLA de clase I (Becker et al., 1999; Liu et al., 2001; van Oijen et al., 2004). Estos antígenos pertenecen a las categorías contenidas en la Tabla 9 y podrían

subdividirse en tres grupos principales: antígenos específicos de cancer no melanoma (e.g. MAGE, BAGE, PRAME, y NY - ESO - 1), antígenos de diferenciación melanocítica (e.g. tirosinasa, Melan - A/MART-1, GP100, TRP - 1 (5,6-dihidroxyindole - 5 - carboxylic acid oxidase) y TRP-2 (DOPAchrome tautomerase), y antígenos expresados de un modo aberrante o mutados (e.g. MUM - 1, CDK4, beta - catenin, gp100 - in4, p15, y *N* - acetilglucosaminil transferasa V). Las células T CD4⁺ también pueden reconocer una variedad de epítomos restringidos por moléculas HLA-II que presentan antígenos de melanoma (Topalian et al. 1994a; Topalian et al., 1994b; Heinzl et al., 2001).

CATEGORIA	DESCRIPCIÓN	EJEMPLOS
Antígenos virales	Tumores inducidos por virus (v.g. EBV, HPV)	EBNA - 1, E6, E7
Mutación puntual	Única para cada tumor	MUM - 1, CKD - 4 p53, caspasa - 8
Antígenos de diferenciación melanocítica	Expresados en líneas de tejidos	Tirosinasa, TPR - 1, TPR - 2, GP100, Mart - 1
Antígenos cáncer testicular	Expresados en gran parte durante el desarrollo y cánceres	MAGE, NYO - ESO - 1
Antígenos crípticos	Asociados con procesos de transcripción y traslación aberrante	RU2, GnT - V, HPX42B
TEIPP	Asociados con defectos en procesamiento de antígeno	CALCA

El desarrollo de la tecnología de complejos tetraméricos reactivos consistentes en moléculas de HLA de clase I y un péptido específico, ha permitido la cuantificación y caracterización fenotípica de las células T CD8⁺ específicas del tumor (Lee et al 1999) al tiempo que profundizan en el conocimiento de la respuesta inmunitaria contra los antígenos del melanoma. Al mismo tiempo, la expansión *in vitro* de células T específicas ha permitido la caracterización funcional de diferentes subclases de células T (Bullock et al 2001; Van Oijen et al., 2004). Tales abordajes han mostrado que diferentes antígenos asociados al melanoma pueden estimular una respuesta específica contra el tumor tanto de células T CD8⁺ como de células T CD4⁺ (Li et al 1994). No obstante, las células tumorales pueden eludir la inmunovigilancia del huésped, sobre todo mediante inducción de un estado de tolerancia; por lo que, como se ha apuntado en el caso de las células NK, persiste la necesidad de conocer

los diferentes mecanismos inmunosupresores inducidos por la enfermedad que pueden ser responsables de la diseminación de la misma.

Todo lo anterior, confirma el hecho de que las respuestas antitumorales puedan ser optimizadas induciendo respuestas mas eficaces, ya sea por respuestas heteroclíticas o por presentación de antígenos propios alterados. De hecho, hoy en día se están utilizando estas estrategias para el desarrollo de nuevas pautas inmunoterapéuticas (Okamoto et al., 1998; Oble et al.,2009).

10. RECEPTORES NK (NKR) Y SUS CORRESPONDIENTES LIGANDOS

Entre los diferentes componentes del sistema inmunitario, los linfocitos T TCR CD8⁺ y las células NK son importantes efectores citotóxicos implicados en la defensa frente al melanoma (Lee et al., 1999; Jovic et al., 2001). Su actividad citotóxica es regulada a través del balance entre señales de activación y de inhibición mediadas por los NKR descritos inicialmente en las células NK pero también se sabe que pueden estar presentes en linfocitos T (Long et al., 1999; Parham, 2003; Vivier et al., 2004).

Dentro de la población T CD8⁺ existen datos que indican que los NKR se expresan preferentemente en la subpoblación T CD8⁺28⁻ y de que esta subpoblación está incrementada en el envejecimiento y en situaciones de estimulación crónica lo que sugiere que la expresión de NKR en esta subpoblación constituye un mecanismo regulador de sus funciones efectoras (Speiser et al., 1999b; Tarazona et al., 2000; Tarazona et al., 2002)

La observación de que las células NK preferentemente lisaban células que carecían de HLA-I en su superficie predijo la existencia de receptores inhibidores capaces de regular la actividad NK (Figura 20). Por otra parte, la activación de las células NK contra células que carecían de HLA-I hizo que se asumiese que la actividad citotóxica era una respuesta “por defecto” frente a cualquier célula que no expresase HLA-I. No obstante esto no era totalmente cierto ya que las células NK no lisan eritrocitos humanos, que no expresan HLA-I, y raramente matan células en

reposito normales aunque éstas expresen niveles muy bajos de HLA-I. Realmente, la “citotoxicidad por defecto” o “*missing self cytotoxicity*” no podía explicar cómo las células NK pueden atacar algo que no pueden reconocer de forma positiva. Los recientes descubrimientos de la plétora de receptores activadores de las células NK (Figura 21) ayudan a resolver la cuestión de cómo las células NK reconocen sus dianas potenciales (Lanier, 2003).

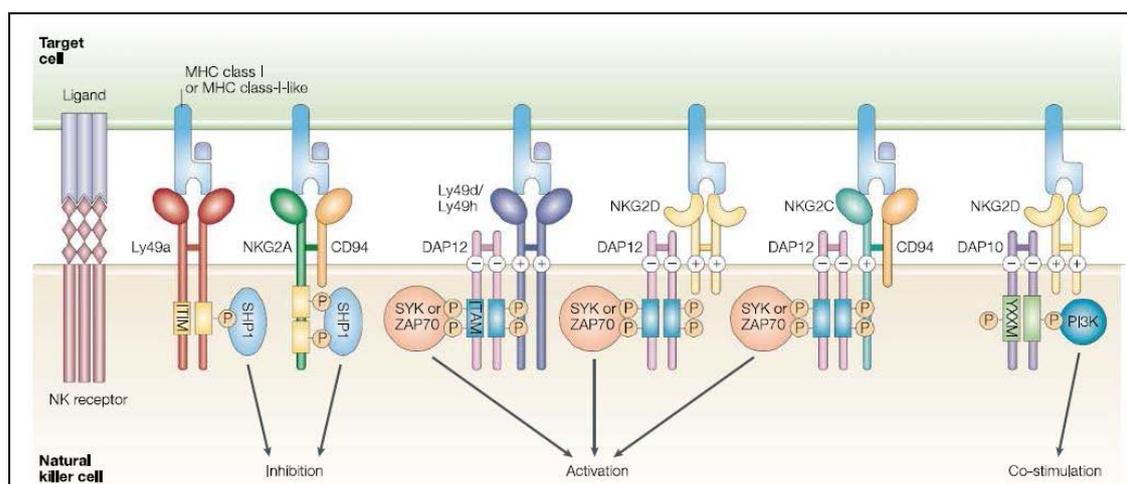


Figura 21. Receptores de células NK. Células NK expresan muchos receptores de la superficie celular que se pueden agrupar en activar (verde), inhibidor (rojo), la adhesión (azul), citoquinas (negro) y los receptores quimiotácticos (Púrpuras). Además de HLA de clase I -receptores específicos, otros receptores inhibidores de células NK específicas para ligandos no - HLA también regulan la reactividad de las células NK (78). También se indican las moléculas adaptadoras que intervienen en la cascada de señalización corriente abajo de la participación de los receptores activadores (verde). La lista de moléculas de superficie celular que participan en la regulación de la función de ratón y células NK humana no es exhaustiva. Salvo que se indique (h, humana; m, murino), los receptores se conservan en ambas especies. *Vivier et al. Ciencia. 2011, 331 (6013):44 - 9.*

En este contexto, se han caracterizado un número creciente de inmunoreceptores, que estimulan funciones estimuladoras o inhibitoras (Figura 21), entre ellos tenemos: los receptores KIR, los receptores KLR, los receptores leucocitarios tipo inmunoglobulina (LILR, del inglés, leukocyte immunoglobulin – like-like receptors) y receptores NCR (Lanier, 2005; McQueen et al., 2002; Vivier et al., 2011). La mayoría de ellos se expresan de una manera estocástica por lo que cada clon NK de un individuo determinado no expresa el conjunto completo de estos receptores codificados por los genes de esas moléculas presentes en su genoma, sino que expresa únicamente un grupo de esos receptores codificados por una parte de

esos genes combinados aparentemente al azar (Valiante et al., 1997; Raulet et al., 2001). La expresión de ese variado grupo de receptores inhibidores o activadores que, además, pueden ser específicos o no específicos para HLA de clase I, da como resultado una gran heterogeneidad de subpoblaciones NK que pueden actuar en un vasto rango de situaciones y con capacidades funcionales diferentes que les hace críticas para la rápida detección y acción frente a células diana infectadas y/o transformadas (Figura 20).

Como las células NK circulan en un estado tal que pueden realizar funciones efectoras espontáneamente, es necesario poder bloquearlas de forma que no ataquen a los tejidos sanos; para ello, las células NK de sangre periférica expresan al menos un receptor de inhibición restringido por moléculas HLA-I que las provee de un estado de tolerancia frente a las células sanas que normalmente expresan altas cantidades de moléculas HLA-I (Valiante et al., 1997; Farag et al., 2006). Esta característica distribución de receptores inhibidores permite a las células NK detectar incluso pérdidas de un solo alelo (López-Botet et al., 1996; Moretta et al., 1966; Moretta et al., 1997). Ciertamente, dentro de ciertos estados patológicos como infecciones, estrés o transformación neoplásica las células sufren una disminución de la expresión de moléculas HLA de clase I en su superficie lo cual favorece que estas células patológicas puedan ser eliminadas por las células NK (Figura 20), este fenómeno es conocido como hipótesis de la “pérdida de lo propio” o “*missing self*” (Ljunggren et al., 1990; Farag et al., 2006).

Por otra parte, las células NK tienen receptores activadores que reconocen ligandos similares a las moléculas HLA de clase I en la superficie de sus dianas. De hecho, dentro de determinadas condiciones, la citotoxicidad de las células NK sobre las células patológicas se incrementa gracias a que las células diana que expresan determinados receptores inducibles por estrés que actúan como ligandos para los receptores NK, entre estos ligandos tenemos los MIC-A y MIC-B (Fuertes et al., 2008), reconocidos por NKG2D, que son proteínas codificadas dentro de la región HLA humana y cuya estructura está relacionada con las moléculas HLA de clase I, moléculas HLA de clase I modificadas y otras moléculas como la ULBP y RAET cuyos genes no están dentro de la región HLA (Malarkannan, 2006). Una

característica común en todas estas moléculas reconocidas por los receptores NK, es que sus estructuras presentan homologías con las moléculas HLA de clase I (McQueen et al, 2002; Malarkannan, 2006; Mistry et al, 2007). De hecho, el consenso general es que la activación y acción citotóxica de las células NK es la resultante entre las fuerzas inhibitoras inducidas por interacciones “*missing self*” o “pérdida de lo propio” en oposición de las señales activadoras desencadenadas por la estimulación de los receptores activadores tras las interacciones “*induced self*” o “inducción de lo propio” (Malarkannan, 2006; Farag et al., 2006; Mistry et al, 2007).

Entre los NKR cuyos ligandos no son las moléculas de HLA-I o estructuras moleculares relacionadas con esas moléculas encontramos, entre otros, las moléculas CD57, CD56 y CD161, también denominada NKR - P1A (Pittet et al., 2000; Brenchley et al., 2003; Lanier et al., 1994; Strioga et al., 2011).

CD57, es una glicoproteína que se describió por primera vez en 1981 en ^{CD57} las células NK (Abo et al., 1981). Esta molécula tiene un glucoepítipo con una característica estructural única, un ácido glucurónico sulfatado unido a lactosamina en los extremos no reductores de los glicanos, que le confiere implicaciones clínicas relevantes gracias a su participación en mecanismos de adhesión célula - célula y célula - matriz extracelular (Morita et al., 2009; Focosi et al., 2010).

CD57 se expresa también en linfocitos T donde generalmente se le considera como un marcador de senescencia (“*clonal exhaustion*”), estas células tienen mayor susceptibilidad a morir tras activación y son incapaces de entrar en nuevos ciclos de división celular pero preservan su capacidad de secretar citoquinas tras interactuar con el antígeno que reconocen (Brenchley et al., 2003). Diversos estudios han mostrado un incremento de las células T $CD8^+CD57^+$ en individuos con activación inmune crónica como infección por CMV (Wang et al., 1993) o HIV (Stites et al., 1986) y en pacientes con tumores (Weekes et al., 1999; Sze et al., 2001). Esta expansión generalmente es oligoclonal dentro del compartimento de células T $CD8^+CD28^-$ (Morley et al, 1995; Batliwalla et al., 1998; Characiejus et al, 2008). Las células T $CD57^+$ juegan un papel importante en las respuestas de tipo T cooperadoras 1 (Th1, del inglés, *T helper 1*). Por otra parte, la capacidad citotóxica antitumoral de las células T $CD57^+$, aunque es menor que la de las células T $CD56^+$,

es mayor que la de las células T CD8⁺ normales; además, las células T CD57⁺ son potentes productoras de IFN - gamma lo cual puede ser relevante en su actividad antitumoral.

La población de células T CD57⁺ suele incrementarse con la edad, variando desde su ausencia en los recién nacidos como alcanzar 15 - 20% en las sangre periférica de los adultos, hecho que posiblemente está íntimamente relacionado con los cambios inmunológicos asociados a la edad como los relacionados con una estimulación antigénica repetida (Merino et al. 1998; Ohkawa et al., 2001). También se ha reportado el incremento de T CD8⁺CD57⁺ en situaciones clínicas como infecciones por CMV, artritis reumatoide, reacciones injerto contra huésped tras trasplante alogénico de médula ósea y en leucemias. Esta población puede llegar a representar entre 10 - 70% de las células T CD8⁺ en individuos sanos (Pittet et al., 2000).

10.1. CD56

La molécula de adhesión de la célula neural (NCAM, del inglés, *neural cell adhesion molecule*) o CD56 pertenece a la gran familia de las glicoproteínas de superficie que presenta homologías estructurales con los dominios de las inmunoglobulinas y de la fibronectina de tipo III y se expresa esencialmente en las células NK humanas y en una subpoblación de linfocitos T y timocitos activados por IL2, que median en respuestas citotóxicas no restringidas por HLA. También se ha encontrado en algunas líneas celulares de leucemia mieloide (Lanier et al., 1989; Brümmendorf et al., 2001). El CD56 humano está codificado por un único gen que se localiza en el cromosoma 11 y las tiene tres principales isoformas conocidas que se generan como resultados de formas de corte y empalme alternativos y se diferencian en su asociación a la membrana y su dominio intracelular. A saber, el CD56 de 150 kD anclado a la membrana por un fosfatidilinositol y las isoformas CD56 de 140 kD y de 180 kD que tienen ambas un dominio transmembrana polipeptídico, pero sus tallos citoplasmáticos tienen longitudes diferentes (Walmod et al., 2004; Gattenlöhner et al., 2009).

Originariamente, se consideró que CD56 era un mediador de adhesión célula, a célula pero actualmente se le considera también como un receptor cuyas señales repercuten en la adhesión celular, migración, apoptosis, diferenciación, supervivencia y plasticidad sináptica. Esta molécula juega un papel fundamental en la neurogénesis, en la migración neuronal, en el crecimiento de las neuritas (Edelman et al., 1998), en las células neuroendocrinas (Zeronski et al., 2005), en las células NK (Moretta et al. 1990) y en una población de linfocitos T con función citotóxica que no está vinculada al HLA. Recientemente se ha demostrado que el CD56 puede expresarse también en células dendríticas (DC, del inglés, *dendritic cells*) humanas plamocitoides (pDC) y monocitoides (mDC) que, además de conservar sus funciones clásicas como células presentadoras de antígeno, adquieren funciones citotóxicas (Tel J. et al., 2012; Roothans et al., 2013) y actúan como elementos activadores de la inmunidad innata y adaptativa pudiendo tener un papel importante en la respuesta antitumoral (Tel et al., 2013).

Por otra parte, la sobreexpresión de esta molécula se ha asociado con agresividad tumoral, mala respuesta al tratamiento o disminución de la supervivencia en muchas neoplasias malignas, entre ellas, algunas neoplasias de células hematopoyéticas (Raspadori et al., 2001), numerosos carcinomas (Gattenlöhner et al., 2009) y melanomas malignos (Johnson et al., 1999; Abott et al., 2004).

Las señales mediadas por CD56 pueden ser activadas por interacciones homofílicas o tras dimerización heterofílica a través de un amplio rango de moléculas como las relacionadas con la molécula de adhesión neuronal L1, el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 1, el factor neurotrófico derivado de células gliales y proteoglicanos sulfato (Walmod et al, 2004). Asimismo, esta molécula está implicada en uniones homotípicas y heterotípicas entre células citotóxicas y células diana aunque su función precisa tanto en NK como en células T, todavía no se ha dilucidado (Whiteside et al., 1990, Lanier et al.,1991).

A diferencia de las células NK, la expresión de CD56 no es constitutiva en las células T aunque se expresa en algunas subpoblaciones de células T CD4⁺ y T CD8⁺. Tanto en las células NK o en T se expresa predominantemente la isoforma CD56 de 140 kD que contiene seis sitios potenciales de glicosilación profundamente

modificada por ácido polisiálico. El fenotipo T CD8⁺CD56⁺ en células circulantes, que representa entre el 4 - 30% de las células T CD8⁺ en individuos sanos y se corresponde con una población con función efectora, que posee grandes cantidades de perforina y granzima B intracelular y actividad remarcadamente citotóxica (Pittet et al., 2000). La capacidad citolítica de los linfocitos T CD56⁺ puede verse inhibida en ciertos tumores como el melanoma (Speiser et al., 1999) o su porcentaje reducido en ciertas situaciones clínicas como se ha observado en pacientes con infección por HIV (Tarazona et al., 2002).

10.2. CD161

CD161 o NKR - P1A es una glucoproteína KLR de tipo C o lectina de la que se han descrito tres genes en la rata y el ratón, NKR - P1A, NKR - P1B, NKR - P1C, que están localizados en el cromosoma 4 en la rata y en el cromosoma 6 en el ratón, pero en humanos sólo se ha identificado un gen en el cromosoma 12 que codifica para una proteína homóloga la NKR - P1A. CD161 se expresa como homodímeros de aproximadamente 80 kD unidos por enlaces disulfuro en casi todas las células NK y en una subpoblación de células T que representa ~20% de las células T humanas de sangre periférica (Lanier et al., 1994). Dentro de la población T, CD161 se expresa con alta intensidad únicamente en células T de memoria CD45RO⁺ con fenotipo CD8⁺CD28⁺ (Werwitzke et al., 2003), lo que les diferencia del resto de NKR que suelen expresarse mayormente en la población T CD8⁺CD28⁻ y con fenotipo naive CD45RA⁺ (Speiser et al., 1999a; Speiser et al., 1999b; Werwitzke et al., 2003). Además, esta molécula se expresa de manera específica en células NKT con el TCR invariante (V α 24V β 11) (Takahashi et al., 2000) y también lo hace en células T TCR $\gamma\delta$ y en una subpoblación de timocitos CD3⁺ (Lanier et al., 1994).

La expresión de CD161 define subpoblaciones de células T CD4⁺ y T CD8⁺ con diferentes actividades funcionales (Werwitzke et al., 2003; Billerbeck et al., 2010); por ejemplo, las poblaciones T CD4⁺CD161⁻ y T CD8⁺CD161⁻ suelen contener preferentemente células T vírgenes CD45RA⁺, que segregan grandes cantidades de IL2 tras su estimulación *in vitro* mientras que las poblaciones CD4⁺CD161^{int} y CD8⁺CD161^{int} contienen generalmente células T efectoras y de

memoria CD45RO⁺ que segregan grandes cantidades de IFN γ y TNF α . Además, todas ellas proliferan vigorosamente *in vitro* pero no tienen actividad citolítica. Sorprendentemente, la población T CD8⁺CD161⁺ contiene una subpoblación de fenotipo CD8a⁺CD8b^{low/-}CD161^{high} que es anérgica, no prolifera ni secreta citoquinas y tampoco interviene en la actividad lítica de las células NK (Takahashi et al., 2006).

Aunque inicialmente se describió la expresión de CD161 como una molécula asociada con actividad citotóxica antitumoral (Yrlid et al., 1996), en los últimos años se ha observado que, el receptor humano NKR - P1A puede inhibir la actividad citotóxica de las células NK a través de un ligando no HLA, el denominado Transcrito-1 de la familia de las lectinas tipo C1 (LLT1, del inglés, *Lectin Like Transcript - 1*) que se expresa en pDC y mDC activadas por receptores tipo Toll-like, en células B activadas, en células T activadas a través del TCR y en células NK activadas, pero no se detecta en la superficie de las células B, células T, células NK, monocitos y DCs circulantes (Rosen et al., 2005; Mathew et al., 2004; Germain et al., 2011). No obstante, la interacción entre este receptor y su correspondiente ligando regula de un modo diferente la función de las células NK y las células T. De hecho, la interacción específica de CD161/LLT1 inhibe la citotoxicidad y la producción de IFN γ mediada por células NK al tiempo que favorece la producción de IFN γ por las células T activadas a través del CD3 y, por otra parte, las interacciones de CD161 con CD3 aumentan la secreción de IL17. Por todo ello se ha sugerido que las interacciones LLT1/CD161 intervienen en la modulación de las respuestas inmunitarias frente a agentes patógenos. (Aldemir et al., 2005; Sovova et al., 2011).

Recientemente se ha descrito una nueva molécula transmembrana conocida como PILAR, acrónimo de “receptor asociado a la proliferación inducida de los linfocitos” (del inglés, *proliferation - induced lymphocyte - associated*), que es una molécula coestimuladora que hace de segunda señal y actúa específicamente a través de CD161, aumenta la expresión de moléculas que bloquean la apoptosis e induce la secreción de citoquinas tipo Th1. Las interacciones PILAR/CD161 son críticas en la respuesta proliferativa mediada por CD3 e incrementan la proliferación mediada por TCR en linfocitos T humanos. Todo ello apunta a que estas interacciones juegan un

papel crucial modulando la amplitud de la respuesta inmunitaria adaptativa en humanos y tienen implicaciones en los procesos de inflamación, autoinmunidad y cáncer (Huarte et al., 2008).

10.3. Receptores KIR

Como se ha comentado ampliamente en el apartado anterior, la actividad citotóxica de las células NK y T CD8⁺ está regulada por los receptores KIR cuyos ligandos son el polimórfico conjunto de moléculas HLA de clase I y por los receptores KLR (Ohkawa et al., 2001; McQueen et al., 2002; Catros - Quemener et al., 2003).

Los receptores KIR presentan una considerable especificidad de especie y no existen en los roedores por lo que su estudio en humanos es crítico para conocer su impacto en la salud y la enfermedad (Rajalingam, 2011). Estos receptores se expresan en células NK (Natarajan et al., 2002) y en una subpoblación T (van Bergen et al., 2010) y están codificados por un grupo de genes que se encuentran agrupados en una zona de aproximadamente 150 kb, localizada dentro del complejo de receptores leucocitarios (LRC, del inglés, *leucocyte receptor complex*) en el cromosoma 19q13.4 (Rajalingam, 2011).

Como los seres humanos son diploides, generalmente tienen dos copias de genes autosómicos, uno por cada cromosoma; sin embargo, la familia de genes KIR viola esta norma básica debido a deleciones o duplicaciones y, así, los clones NK pueden expresar combinaciones distintas de estos genes dando lugar subpoblaciones de células NK cuyas proporciones varían en diferentes individuos y, además el número de genes KIR en el genoma de cada individuo varía en la población. Hasta la fecha, se han caracterizado más de 30 haplotipos con diferentes contenidos genéticos. Por otra parte, además de la variabilidad genética debida a los distintos haplotipos, cada gen KIR exhibe un polimorfismo considerable en su secuencia de nucleótidos, lo cual favorece que, a diferencia de otros receptores NK, los KIR presenten un grado tal de diversidad (Figura 22) que les confiere diferencias en su expresión, reconocimiento, afinidad, señalización y función (Gendzekhadze et al., 2009, Older - Aguilar et al., 2010).

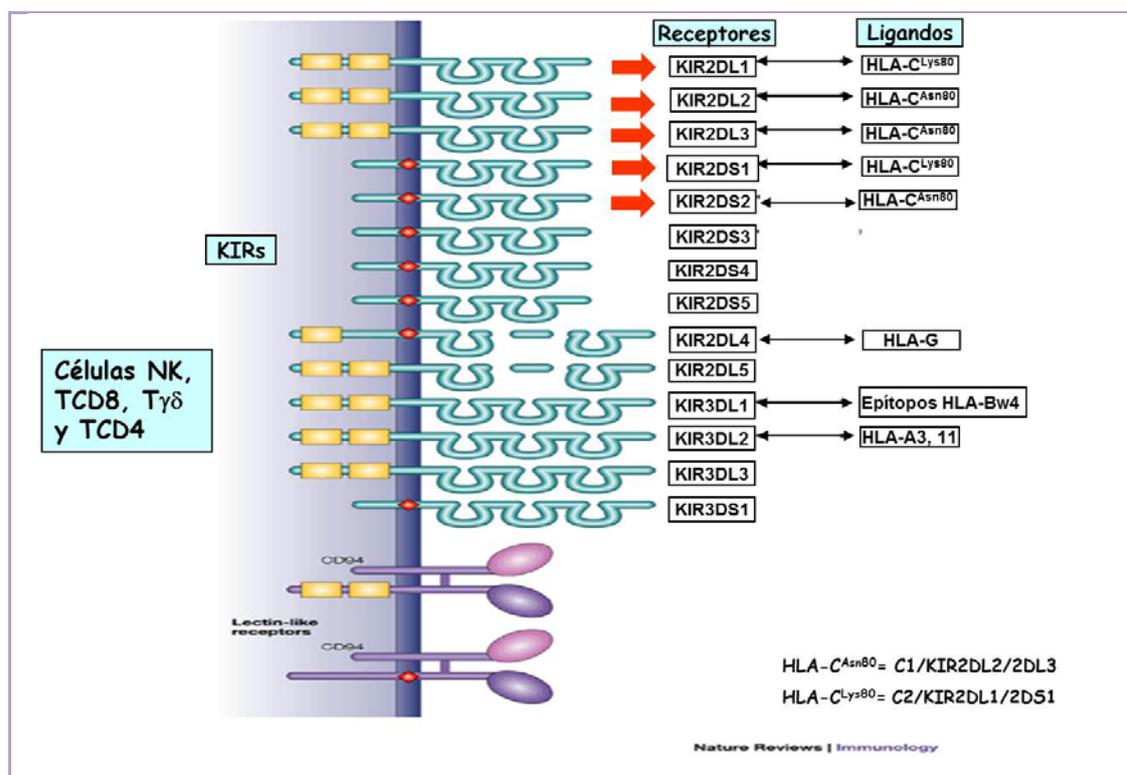


Figura 22. Receptores NK y sus correspondientes ligandos HLA de clase I. Los receptores KIR2DL1/S1 (CD158a) interactúan con moléculas HLA-CLys80, mientras que los receptores KIR2DL2/3 (CD158b) interactúan con moléculas HLA-CAsn80. El receptor KIR3DL1 interactúa con moléculas HLA de clase I que comparten el epítipo HLA-Bw4 y el receptor KIR3DL2 con moléculas HLA-A. Por último, el heterodímero CD94/NKG2 interactúa con la molécula HLA-E. Parham P and McQueen KL; Nat Rev Immunol, 2003; 3:108 - 122.

En estas moléculas se distinguen 3 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, D0, D1 y D2; y, en base a que estas moléculas posean 2 o 3 dominios en la región extracelular, los receptores KIR se clasifican como KIR2D y KIR3D, respectivamente (Figuras 24 y 25). Además, atendiendo al tipo de dominios que poseen, los receptores KIR2D se nominan como tipo I si portan los dominios D1 - D2 o receptores tipo II si portan los dominios D0 - D2, siendo los receptores KIR2D de tipo I los más frecuentes, mientras que los de tipo II solo están representados en KIR2DL4 y KIR2DL5 (Vilches et al., 2000a; 2000b) (Figuras 25). Algunos de estos receptores poseen una región citoplásmica larga con dos motivos ITIM responsables de la función inhibidora (p58 y p70) y se les distingue añadiendo a letra L (del inglés, *long tail*) al final de su nombre, o sea, su nomenclatura es KIR2DL y KIR3DL (Burshtyn et al., 1999) (Figura 22). En humanos se han identificado 14 receptores KIR más dos pseudogenes 2DP1 y 3DP1; de entre los

receptores KIR, unos desencadenan inhibición (KIR3DL1 - 3, KIR2DL1 - 3, KIR2DL5), otros activación (KIR3DS1, KIR2DS1 - 5) y otros ambas acciones (KIR2DL4).

Las señales desencadenadas tras la unión de los receptores inhibidores a las moléculas HLA-I propias, gracias a las cuales las células NK adquieren competencia funcional (Sun, 2010; Yokoyama et al.; 2003), implican fenómenos tales como el de “licenciar”, que así se denomina a la adquisición de la capacidad funcional gracias a esas interacciones moleculares (Yokoyama et al., 2006); “armar”, que define la adquisición de la tolerancia a lo propio de las NK durante su desarrollo (Raulet et al., 2006); y, por último, también “educar” fenómeno por el que las células NK son capaces de discriminar la densidad de moléculas HLA-I en la superficie celular (Anfossi et al., 2006).

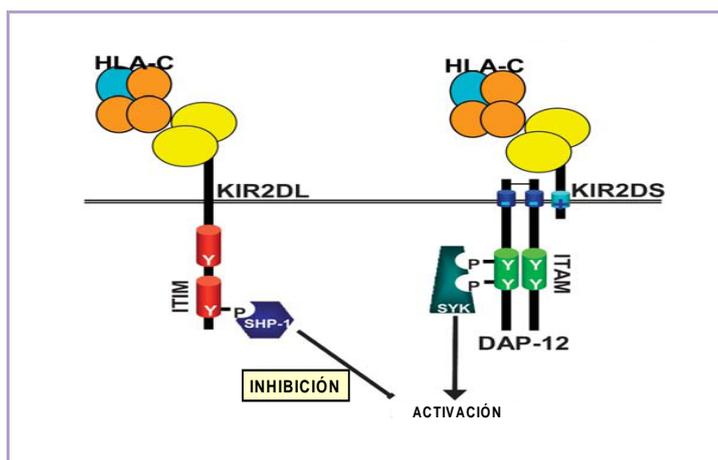


Figura 23. Función de los receptores KIR2D. La señalización intracelular por receptores KIR2D difiere en base a la presencia de un tallo citoplasmático largo (KIR2DL), que media señales de inhibición o corto (KIR2DS), actuando como un receptor de activación. (Adaptado de Farag SS and Caligiuri MA, *Blood Reviews*, 2006; 20:123 – 137).

Otros receptores tienen un tallo citoplasmático corto por lo que, como en el caso anterior, se les añade una letra al final de su nombre, en este caso S (del inglés, *short tail*) (Figura 22). Estos últimos carecen de motivo ITIM (p50) y tienen en su región transmembrana un aminoácido de lisina cargado positivamente a través del cual se asocian electrostáticamente a la molécula adaptadora DAP12, que transduce la señal activadora a través de sus motivos ITAM (del inglés, *immunoreceptor tyrosine - based activating motif*) (Figura 23) implicando a las tirosín-quinasa ZAP70 y syk (Moretta et al., 1997; Vilches et al., 2002; Moretta et al., 2004).

10.4. Ligandos de los Receptores KIR

Como se ha comentado anteriormente, los receptores KIR reconocen estructuras específicas de las polimórficas moléculas HLA de clase I de una manera semejante a como se hace el reconocimiento del TCR. No obstante, estas interacciones son muy diferentes ya que mientras que la unión con el TCR conlleva un cambio conformacional, la unión de los KIR al HLA se hace como elementos rígidos y ello implica que esta interacción sea exquisitamente sensible a las sustituciones de aminoácidos, afectando de manera importante a la especificidad y fuerza de estos reconocimientos (Parham et al., 2005). Entre estos ligandos, los codificados por el locus HLA-C, son mayoritariamente ligandos los receptores KIR (Figuras 25), en particular, los receptores KIR2D (Boyton et al., 2007). El aminoácido de la posición 80 de la hélice alfa del HLA-C y el de la posición 44 del dominio D1 de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 son determinantes para el resultado de la interacción de estas moléculas (Figura 24). Todos los alotipos HLA-C poseen un aminoácido valina (V) en la posición 76 (V76) pero en la posición 80 (Figura 24) presentan un dimorfismo pudiendo presentar el aminoácido asparragina (Asn) o lisina (Lys).

Estudios sobre la afinidad de las interacciones KIR/HLA-C (Figura 24B) han demostrado que el residuo de metionina (Met) en la posición 44 en KIR2DL1 hace que la unión de este receptor al grupo C2 de las moléculas HLA-C sea más fuerte y específica que la unión a las moléculas del grupo C1 del HLA-C de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 que llevan un residuo Lys en esa posición. Además, se ha observado que las interacciones más débiles y menos específicas del grupo HLA C1 con KIR2DL2/3 evolucionaron primero, apareciendo más tarde en el desarrollo evolutivo la más fuerte y específica HLA-C2 - KIR2DL1 (Figura 24 sector B). El hecho de que los alotipos C2 no hayan suplantado a los C1, ambos bien representados en todas las poblaciones humanas, apunta a la existencia de una gran variedad en lo que respecta a la fuerza de inhibición mediada por HLA-C (Moesta et al., 2009).

Cerca de la mitad de alotipos HLA-C llevan el epítipo C2 (HLA-C^{Lys80}) y se unen al receptor KIR inhibidor KIR2DL1 con gran afinidad y fuerza y el resto de los

alelos HLA-C llevan el epítipo C1 (HLA-C^{Asn80}) y se unen los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3, con KIR2DL2 la unión se hace con afinidad y fuerza moderada y con KIR2DL3 la interacción es débil (Winter et al., 2008; Moesta et al., 2008) (Figura 24). Las interacciones de KIR2DL1 con C2 están muy restringidas pero las de los receptores KIR2DL2/3, principalmente las de KIR2DL2, aunque mayoritariamente reconocen C1, también pueden reconocer algunos alotipos C2, en particular C*0501 y C*0202 (Moesta et al., 2008; Moesta et al., 2009).

Las moléculas KIR2DL específicas de HLA-C fueron definidas inicialmente utilizando anticuerpos monoclonales. Posteriormente se observó que dichos anticuerpos también reconocían moléculas KIR2DS ya que éstas tenían dominios extracelulares de secuencias similares a los KIR2DL; de este modo, se describió que KIR2DS1 (CD158a) tenía reacciones cruzadas con KIR2DL1, y KIR2DS2 (CD158b) presentaba reacciones cruzadas con KIR2DL2/3 (Figura 25). Los receptores KIR2D mejor caracterizados son KIR2DL1/S1, representados por las moléculas CD158a/h (Parham, 2005) y KIR2DL2/S2 y KIR2DL3 (CD158b/j).

Como hemos visto anteriormente, a pesar de las similitudes estructurales en el dominio inmunoglobulina extracelular, las diferencias estructurales entre ellos les confieren propiedades diferentes (Figura 25); el receptor activador KIR2DS1 se une a los alelos de HLA C del grupo C2 con menor avidéz que el receptor inhibidor KIR2DL1 a pesar de reconocer la misma estructura en la molécula HLA C (Biassoni et al 1997; Vales-Gómez et al 1998; Stewart et al., 2005) y la unión de KIR2DS2 a HLA C no ha sido detectada a pesar de que su estructura aminoacídica extracelular posee un 99% de identidad con los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 (Winter et al., 1998; Saulquin et al., 2003) (Figuras 25 y 28).

Todo lo expuesto respecto a la interacción KIR/HLA C proporciona a los individuos la flexibilidad para expresar hasta cuatro isoformas HLA I teniendo combinaciones C1 - C2 lo que conlleva una diversidad en la acción por la modulación de la función de estas células (Figura 26).

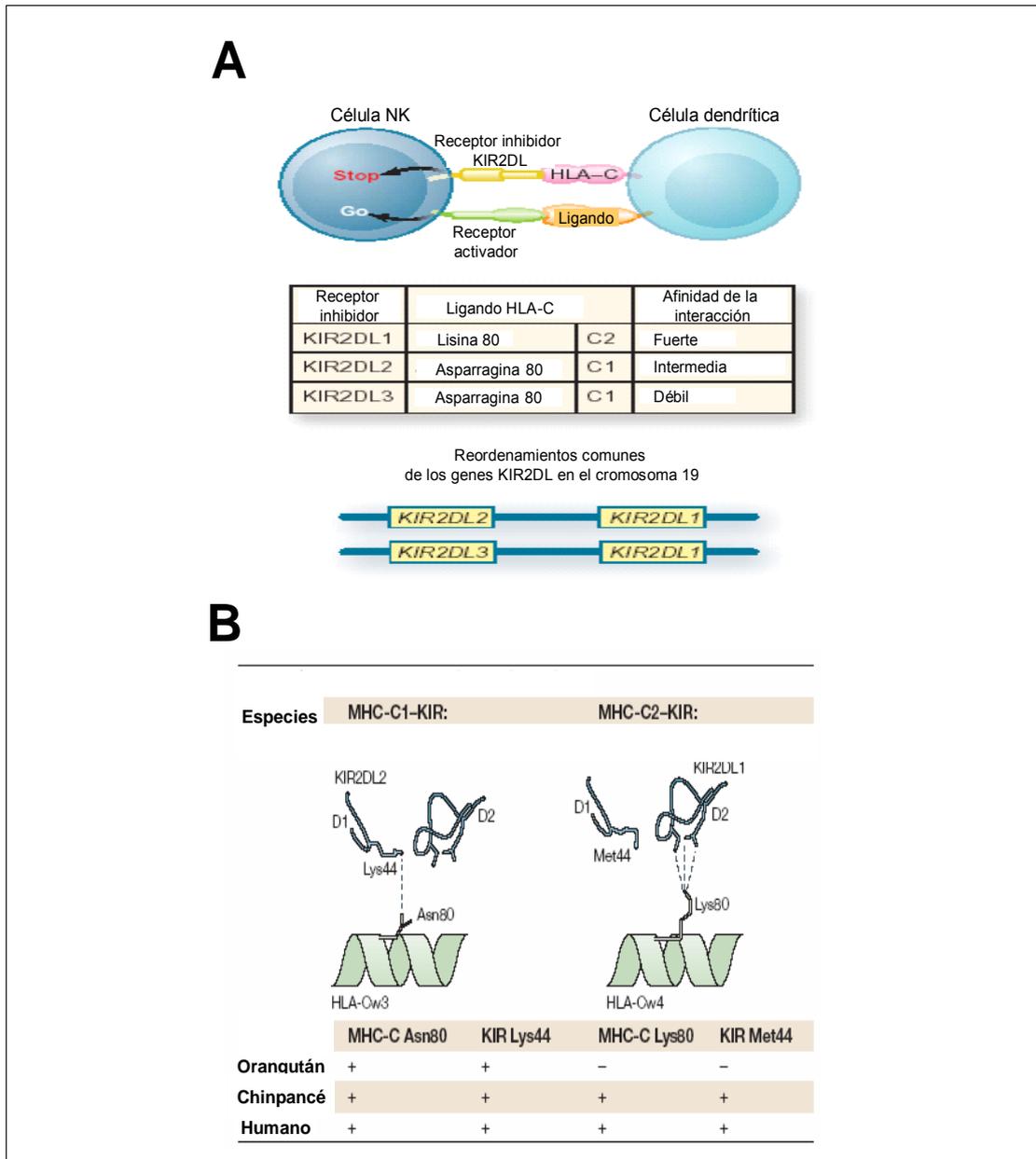


Figura 24. Afinidad de la interacción KIR2DL/HLA-C. La actividad de las células NK viene determinada por la integración de señales procedentes de receptores activadores y receptores inhibidores tal como KIR2DL además la afinidad y fuerza de la interacción es muy dependiente del aminoácido de la posición 80 de la hélice alfa del HLA-C y de la posición 44 del dominio D1 de KIR2DL1, KIR2DL2 Y KIR2DL3.(A). La interacción entre los alelos HLA-C - C2 y el receptor KIR2DL1 presenta la mayor afinidad (A). Esto es debido a la presencia de tres puentes de hidrógeno entre HLA-C - C2 - KIR2DL1 frente a un solo puente de hidrógeno entre HLA-C - C1 - KIRDL2. En la parte inferior de la figura (B) se indican los dos reordenamientos cromosómicos más comunes de los genes KIR2DL, el aminoácido de la posición 80 de la hélice alfa del HLA-C y el de la posición 44 del dominio D1 de KIR2DL1, KIR2DL2 Y KIR2DL3 son determinantes en el resultado de la interacción de estas moléculas. (Adaptado de Parham P, *Science* 2004; 305: 786 – 787, A; Parham P, *Nat Rev Immunol* 2005; 5:201 – 214, B).

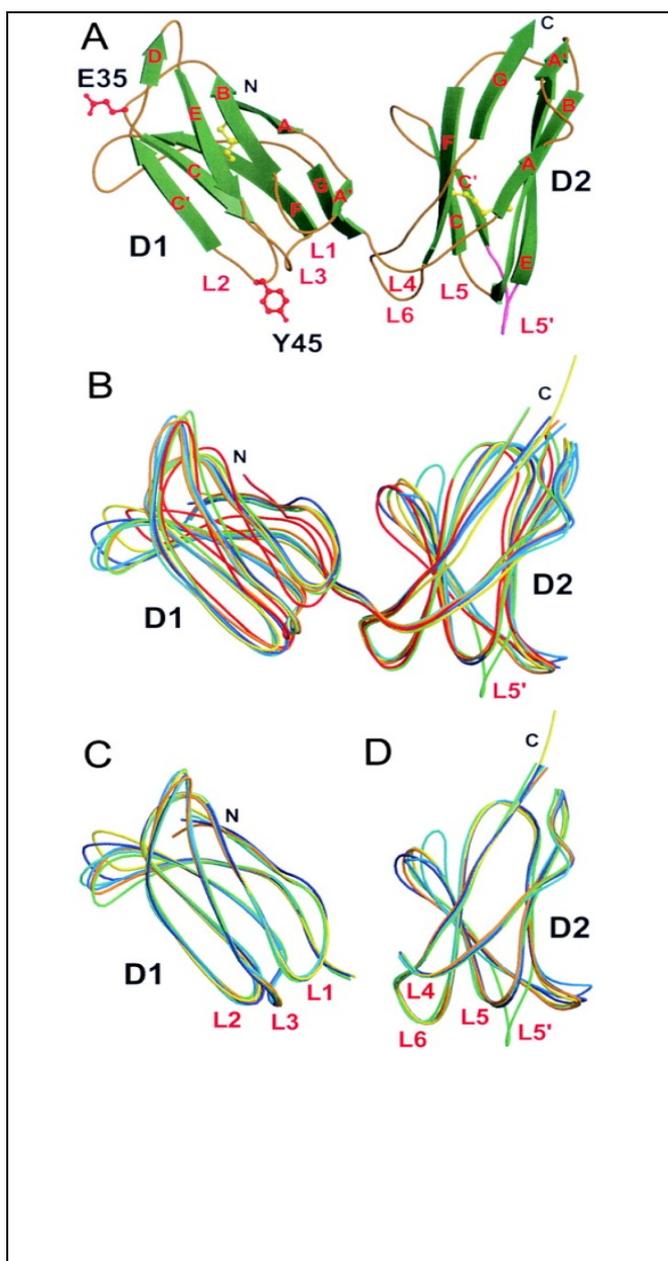


Figura 25. Estructura cristalina KIR2DS2 y su comparación con otras estructuras KIR conocidos. (A) Estructura general de los dominios extracelulares KIR2DS2 que se muestran en la representación de la cinta molecular con las láminas - β en verde y los giros β en amarillo. Los dos aminoácidos diferentes entre KIR2DS2 y KIR2DL3 (que se encuentran dentro del rango de la secuencia aminoacídica 8 - 200), Tyr45 (Y45) y Glu35 (E35), se muestran en color rojo como una forma circular formada con bolitas con una rama vertical. El bucle L5' entre las láminas - β C' y E del dominio D2 se representa en color rosa. Las cisteínas de los dos puentes disulfuro se muestran en representados en bolitas y formas lineales en amarillo. En (B) se representa las superposición de las trazas C α de las moléculas KIR completas gracias a los giros β (residuos 8 - 200), En (C) se representan de forma aislada el dominios D1 (residuos 8 - 102) y en(D) los dominios D2 (residuos 103 - 200) de las moléculas KIR donde se representan como bucles de distintos colores las diferentes moléculas; a saber: KIR2DS2, verde; KIR2DL1, rojo; KIR2DL2 azul oscuro (forma trigonal); KIR2DL2, turquesa (forma ortorrómbica); KIR2DL2, que se une a HLA-Cw3 (KIR - A), naranja; KIR2DL2 libre (KIR - B) así como el complejo cristalino formado por el mismo KIR2DL2 unido a HLA-Cw3, azul marino; por último, KIR2DL3, amarillo. (Adpatado de Saulquin et al. *J Exp Med* 2003;197:933 – 938)

Es interesante reseñar que la interacción del receptor activador KIR2DS1 con su ligando no siempre es suficiente para desencadenar activación de las células NK, ya que esta función depende de la presencia de señales activadoras adicionales o de la reducción de las señales inhibitoras. De hecho, se atribuye al receptor KIR2DS1 un posible papel modulador pues se ha visto que el aumento del grado de activación de las células NK no siempre consigue desencadenar en ellas una respuesta efectiva pero sí se ve incrementada su propensión a realizar acciones citotóxicas o a producir citoquinas pro-inflamatorias (Stewart et al., 2005).

Por otra parte, existen dos alotipos HLA-B excepcionalmente diversos, HLA-B46 y HLA-73, que portan V76 y Asn80 por lo cual son buenos ligandos para los receptores KIR2DL2/3 y además, el ligando HLA-B46 es un buen educador para las células NK que expresan KIR2DL3 (Moesta et al., 2009; Yawata et al., 2008).

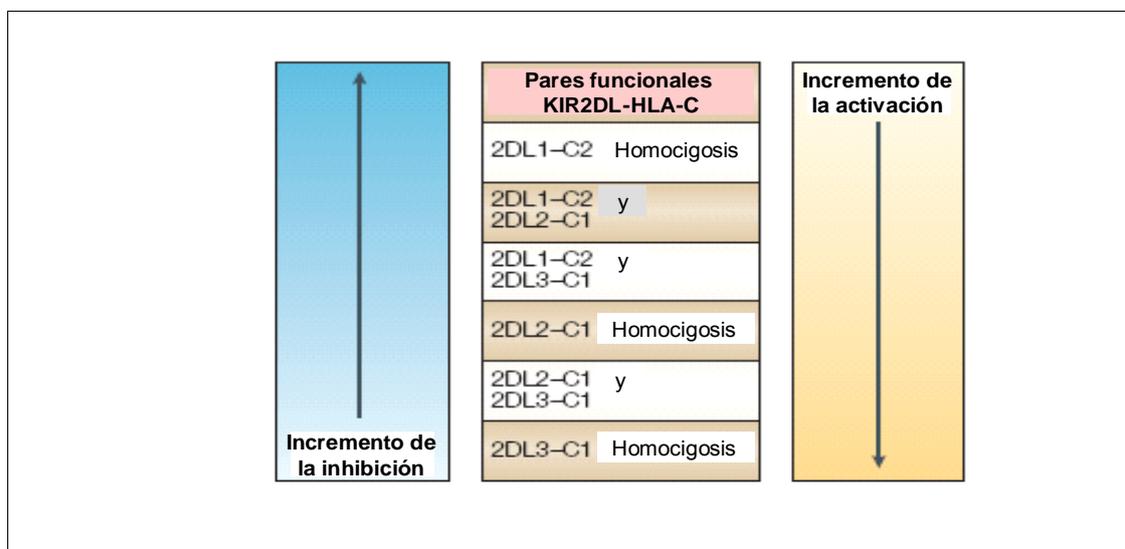


Figura 26. Jerarquía de inhibición mediada por la unión de los receptores KIR2DL a sus correspondientes ligandos HLA-C. De entre todas las posibles combinaciones, los receptores KIR2DL1 con moléculas HLA-C del grupo C2 en homocigosis es la combinación que media una inhibición más intensa. (Adaptado de Parham P, *Nat Rev Immunol* 2005; 5:201 – 214)

Desde un punto de vista funcional se ha demostrado que, curiosamente, la interacción entre los receptores KIR y sus correspondientes ligandos inducen una señal de inhibición, que predomina sobre las señales de activación, previniendo la lisis de las células diana (Vitale et al., 1995; Bakker et al., 1998; Long et al., 2001; Igarashi et al., 2004; Khakoo et al., 2004; Parham 2004; Zhang et al., 2012).

Por otra parte, los receptores KIR3DL1 y KIR3DL2 interaccionan respectivamente con los alelos de HLA-B que portan el epítipo HLA-Bw4 y con algunas moléculas de HLA-A (Frag and Caligiuri, 2006), tal como se ilustra en la Figura 22 (Frohn et al., 1997; Pascal et al., 2002a; Pascal et al., 2002b).

La adquisición de los receptores inhibidores es un proceso ordenado que ocurre durante el desarrollo de las células NK, las cuales en sus primeros estadios expresan los receptores CD94:NKG2A y posteriormente los KIR en humanos y Ly49 en ratones (Figura 17). Esta jerarquía se refleja en la restauración medular de los

pacientes sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas en los que sus células NK expresan inicialmente NKG2A pero no KIR, y sólo más tarde comienzan a expresar estos últimos (Shilling et al., 2002; Shilling et al., 2003; Yawata et al., 2008; Caliguri et al., 2008).

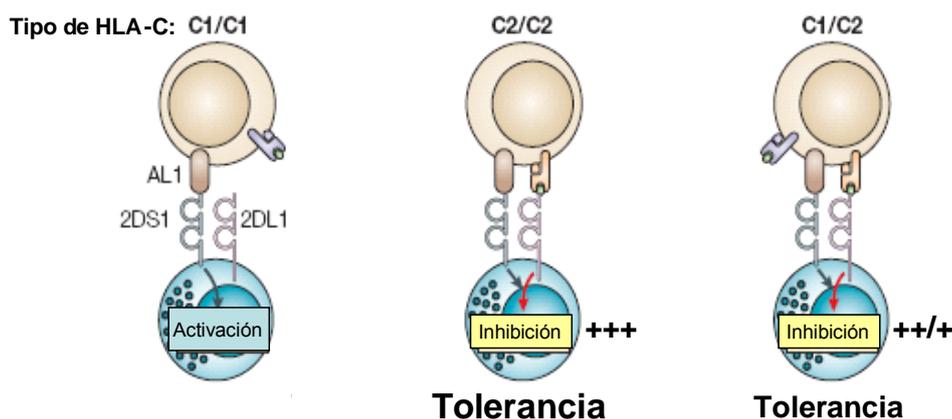


Figura 27. Modelo de inducción de tolerancia mediado por el par KIR2DL1/HLA-C2. Cuando ambos receptores KIR2DL1/S1 unen su ligando HLA-C2, la señal inhibitoria domina, llevando a un estado de tolerancia.

Respecto a la expresión de los receptores KIR, parece que en células NK maduras es constitutiva (Moreta et al 1992) mientras que puede ser inducida en células T bajo condiciones particulares. Además, los datos que hay hasta la fecha indican que la expresión de KIR en células NK es estable, ya que las células NK maduras no modifican su fenotipo KIR como consecuencia de la activación celular, proliferación o clonaje en experimentos realizados *in vitro* (Moretta et al., 1994; Moretta et al., 1996). Por último, es de destacar que la expresión de los genes KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en células NK humanas ocurre de un modo clonal (Moretta et al., 1990; Ciccone et al 1992; Miller et al., 2001), ya que la presencia de un gen KIR no significa que éste sea expresado (Valiante et al., 1997; Torkar et al 1998; Long et al 2001). En el caso de los linfocitos T, en la mayoría de los individuos, los receptores KIR son expresados por linfocitos T CD8⁺ pero son infrecuentes en células T CD4⁺ (Mingari et al 1996). Además, el análisis de marcadores de fenotipo T memoria/naive reveló que las células T KIR⁺ carecen de CD28, mientras que

expresaban altos niveles de CD18, CD29, CD57 y CD45RO (Mingari et al., 1996). Estos datos, junto con la ausencia de células T KIR⁺ en el timo y en la sangre de cordón (Mingari et al 1997), son consistentes con un fenotipo memoria e indican que representan células activadas *in vivo* (Mingari et al., 1998).

10.5. Ligandos de los Receptores NK (NKR)

Como también se indicó anteriormente, una segunda superfamilia de receptores de células NK son los receptores heterodiméricos de la familia de las lectinas tipo - C, los cuales están compuestos de una subunidad (CD94) unida covalentemente a una molécula de la familia NKG2 perteneciente a la familia de las lectinas tipo - C (Lanier, 1998), como se representa en la Figura 22.

La molécula CD94 carece de dominio citoplasmático para mediar la señal de transducción intracelular por lo que su especificidad funcional viene determinada por los dominios extracelular y citoplasmático de las moléculas NKG2, que incluyen NKG2A con su variante NKG2B, NKG2C, NKG2E con su variante NKG2H y NKG2F. Por lo que respecta a su especificidad, los heterodímeros CD94/NKG2 se unen específicamente la molécula no clásica HLA-E (Lee et al., 1998; Long et al. 1998) y, como se comentó anteriormente, se han descrito diferencias funcionales entre los diferentes alelos de HLA-E (R versus G) en relación a la citotoxicidad NK ya que la interacción de HLA-E con su ligando depende de los péptidos presentes en la secuencia señal de las moléculas HLA-I pudiéndose lograr o no la inhibición de la lisis por las células NK (Maier et al., 2000).

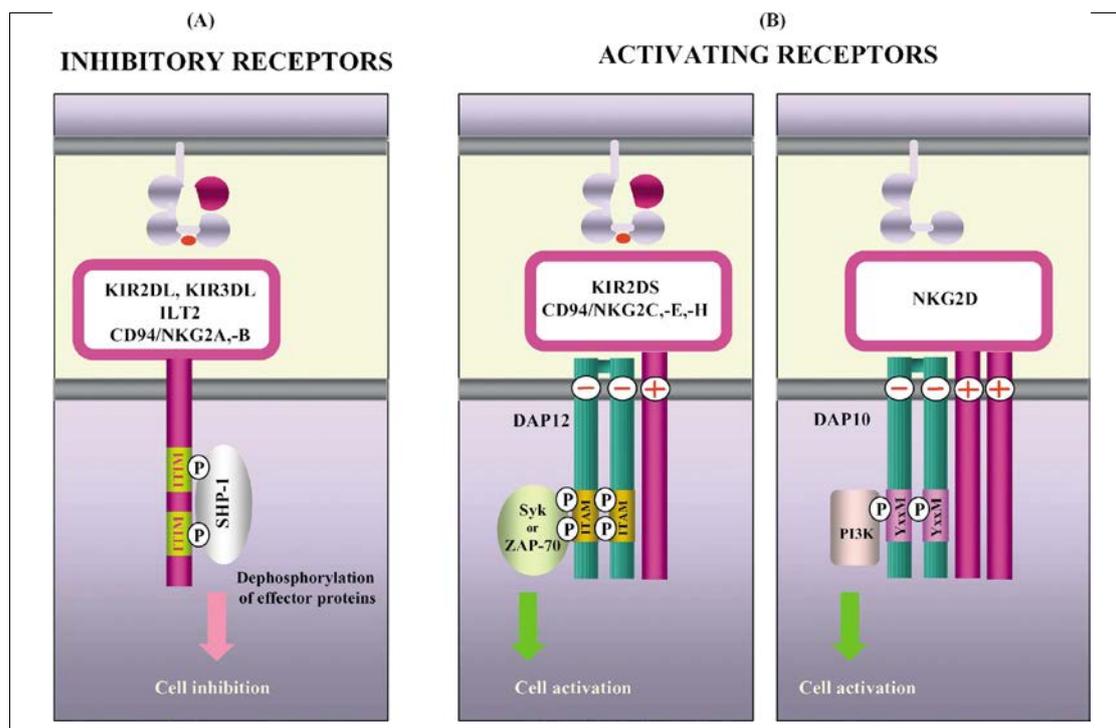


Figura 28. Mecanismo de transmisión de señales entre los receptores NK y las moléculas HLA de clase I. (A) Señal de inhibición generada por la interacción de los ITIM de los receptores de inhibición con SHP-1 cuya activación lleva a la desfosforilación de proteínas necesarias para la activación. (B) La señal de activación se produce tras la interacción de los receptores de las células NK con los ITAM que de la proteína adaptadora DAP12 que lleva al reclutamiento y activación de proteínas tirosina quinasas como Syk o ZAP-70 o, en el caso de NKG2D, donde la señal de activación se desencadena por de la interacción del receptor con la proteína adaptadora DAP10 que en lugar de ITAM tiene un motivo YxxM activa la quinasa PIP3. (Adaptado de Borrego et al., *Molecular Immunology*. 2002; 38: 637–660)

De forma similar a lo que ocurre con los receptores KIR de tallo largo, la subunidad NKG2 del heterodímero CD94/NKG2A tiene un tallo intracitoplasmático largo con dos motivos ITIM que median una señal inhibitoria, mientras que las subunidades NKG2-C, -E – H que tienen tallos citoplasmáticos cortos no poseen motivos ITIM pero poseen un aminoácido cargado en su dominio transmembrana que puede interaccionar con la proteína adaptadora (DAP12) portadora de motivos ITAM que son transmisores de señales activadoras (Agrawal et al., 2008).

CD94/NKG2 se expresa en la membrana de las NK en estadios tempranos de diferenciación, antes de que aparezcan los KIR (Figura 17). Como los KIR los receptores CD94/NKG2 no se expresan en células T naive y su está restringida a la población T CD8⁺ aunque no se sabe muy bien que factores la inducen; por el contrario, sí se sabe que CD94/NKG2 puede ser inducido en linfocitos T CD8⁺ tras

ser estimulados por superantígenos o anticuerpos anti-TCR en presencia de IL15 o IL10. Además, CD94/NKG2 puede actuar como regulador de las respuestas de linfocitos T CD4⁺, pues tras ser activadas en presencia de TGFβ e IL10 dan como resultado la inhibición de la secreción de TNFα e IFNγ (Romero et al., 2001; Borrego et al., 2001). Existe una molécula NKG2D (Figura 28), lejanamente relacionada con NKG2, que no se dimeriza con CD94 sino que se presenta como un homodímero, pero como no tiene un motivo intracelular que le permita transmitir señales, en lugar de asociarse con DAP12, lo hace con la molécula DAP10 (Figura 28) que se presenta fundamentalmente en células hematopoyéticas y que en su dominio intracitoplasmático posee un aminoácido que interacciona con un PIP3 dando señales de activación a las células NK (Borrego et al., 2002).

En las últimas décadas, se ha descrito una asociación entre ciertas subclases de linfocitos T CD8⁺ y células NK que expresan NKR con diferentes patologías, incluyendo las enfermedades autoinmunes, infecciosas o tumorales (Holm et al., 2005, Rajagopalan and Long, 2005; Vetter et al., 2000; Nickoloff et al., 1999; Nelson et al., 2004; Khakoo et al., 2004; Carrington et al., 2005). En estas publicaciones se señala la posible relevancia de los receptores KIR y sus correspondientes ligandos, lo que ha acrecentado el interés de su estudio (Bakker et al., 1998; Rajagopalan et al., 2005). De hecho, gracias al descubrimiento de los receptores KIR en células NK y células T, así como de la regulación que ejercen sobre la actividad citotóxica de las mismas (Farag et al., 2006; Mingari et al., 1998a; Mingari et al., 1998b; Wong et al., 2011), se han abierto nuevas fronteras en el conocimiento inmunológico y se ha llegado a una mejor comprensión de los mecanismos que están implicados en procesos de inmunoregulación o que pueden mediar en el control de infecciones o del crecimiento tumoral y que ofrece la interesante perspectiva de su posible aplicación en la inmunoterapia del cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El melanoma cutáneo además de ser el cáncer que más aumenta cada año, presenta una evolución clínica impredecible que podría estar influenciada por complejas interacciones entre los diferentes antígenos HLA y las células T específicas de antígeno tumoral o las células NK, ambas implicadas en la respuesta antitumoral y, por ende, en la respuesta contra el melanoma.

La expresión de las moléculas HLA de clase I es esencial para el reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T CD8⁺. Además, la presentación antigénica mediada por las moléculas HLA de clase II a los linfocitos T CD4⁺ también puede contribuir a potenciar la respuesta inmunitaria frente al melanoma. Por el contrario, las células NK son capaces de eliminar células tumorales en ausencia de las moléculas HLA de clase I ya que éstas pueden inhibir su actividad. A su vez, algunas de las moléculas HLA de clase I también son capaces de inhibir la lisis de células tumorales por linfocitos T CD8⁺.

Por todo ello, es razonable pensar que tanto la susceptibilidad al melanoma como la progresión del mismo podría estar condicionada por los genes HLA. No obstante, hasta la fecha los datos sobre la posible relación HLA y melanoma son todavía controvertidos. Por otra parte, la baja expresión de los antígenos HLA-C y HLA-E en la superficie celular, así como la ausencia de reactivos serológicos altamente específicos, ha limitado el estudio del papel que pueden ejercer esos genes y moléculas.

Por otra parte, hoy está bien establecido que la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK está regulada por el balance entre señales de activación y de inhibición mediadas por receptores de células NK, algunos de los cuales también se expresan preferentemente en una subclase de linfocitos T de fenotipo CD8⁺CD28⁻.

Los receptores NK incluyen receptores no cuyos ligandos no son moléculas HLA de clase I, tales como CD57, CD56, o CD161, y receptores específicos para

esas moléculas, tales como KIR2D y CD94/NKG2, ambos capaces de modular la respuesta citotóxica anti-tumoral de los linfocitos T CD8⁺ y de las células NK.

Por todo ello, puede ser razonable profundizar en la investigación del papel de la diversidad HLA y KIR, así como la expresión de dichos receptores en los linfocitos T CD8⁺ y células NK circulantes en relación con la susceptibilidad o resistencia al melanoma e incluso con el pronóstico de la enfermedad.

2. OBJETIVOS

Bajo esta hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

1. Analizar la diversidad de genes HLA de clase I clásicas (HLA-A, -B y -C) en pacientes con melanoma cutáneo y en la población normal.
2. Examinar igualmente HLA de clase II (HLADR, -DQ) y su impacto en el melanoma.
3. Estudiar también las variantes alélicas HLA-E en pacientes con melanoma cutáneo.
4. Analizar los subtipos de linfocitos T CD8⁺ y células NK que expresan receptores NK en pacientes con melanoma y en la población sana.
5. Verificar si los alelos y alotipos del locus HLA-C son determinantes en la selección del repertorio de células NK o CD8⁺ que expresan KIR2D y su influencia en la susceptibilidad y evolución del melanoma.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En el presente trabajo se ha abordado el análisis de diversos parámetros inmunológicos en pacientes afectados de melanoma que puedan ser condicionantes para la susceptibilidad o protección frente a la enfermedad, así como su correlación con las diferentes formas clínicas o la evolución de la enfermedad.

El estudio recogido en este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), y todos los pacientes y controles incluidos en el estudio lo hicieron bajo consentimiento informado, en un modelo igualmente aprobado por el CEIC- HCUVA.

2. MÉTODO DIAGNÓSTICO DEL MELANOMA

En la práctica clínica el diagnóstico de melanoma se realiza mediante la inspección clínica, la dermatoscopia y la biopsia de la lesión cutánea con el consiguiente estudio anatópatológico.

2.1. Inspección clínica

Hay una serie de signos que ayudan a identificar lesiones pigmentadas clínicamente sospechosas de melanoma o que tienen la posibilidad de evolucionar a un melanoma, en los años 70, el National Health Institute de USA propuso los acrónimos ABCD (Tabla 2) para su descripción:

- (A) Asimetría: es un hecho bien contrastado que las lesiones pigmentadas benignas son simétricas.
- (B) Bordes irregulares: las lesiones benignas terminan en un borde neto, mientras que los melanomas suelen tener bordes mal definidos.
- (C) Coloración diversa: la diversidad de colores es una característica propia y constante de los melanomas (zonas policromas).

- (D) Diámetro superior a 6 mm: estadísticamente, un tamaño superior a 6 mm, se relacionó en un primer momento con mayor tendencia a la malignidad. No obstante, este parámetro parece que tiende a reducirse hasta los 5 mm e incluso 4 mm.

2.2. Dermatoscopia

Esta técnica ha alcanzado hoy en día un puesto muy relevante en la exploración y diagnóstico de este tumor y consiste en un procedimiento de exploración no invasivo que realiza un examen microscópico *in vivo* de la epidermis y dermis. Gracias a la aplicación de una fuente de luz potente y un líquido viscoso traslúcido, que hace transparente la capa córnea, puede visualizarse directamente el patrón morfológico de los melanocitos atípicos y proliferaciones diversas.

2.3. Biopsia de la lesión cutánea

El diagnóstico de certeza del melanoma requiere la extirpación de la lesión sospechosa para ser estudiada bajo el microscopio por un médico anatomopatólogo. La biopsia excisional es la más aconsejable, extirpando el tumor con los márgenes de seguridad adecuados. Solo excepcionalmente, y si no es posible reseca toda la lesión, se optará por una biopsia parcial (biopsia incisional).

3. PACIENTES Y CONTROLES

Para este estudio 174 pacientes Caucásicos con diagnóstico histológico de melanoma cutáneo maligno, en estadios clínicos y con características clínicas diferentes en el momento del diagnóstico, que fueron reclutados en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca entre 1996-2005. En paralelo se estudiaron 356 individuos sanos compatibles en edad y sexo y procedentes de la misma área geográfica.

3.1. Criterios de selección de Pacientes

Los pacientes se seleccionaron siguiendo los siguientes criterios:

3.1.1. Criterios de inclusión

- Melanoma cutáneo primario presente en el momento de la primera visita o extirpado durante los tres meses previos.
- Consentimiento informado del paciente.

3.1.2. Criterios de exclusión:

- Presencia o antecedente de otros tumores malignos.
- Inmunodeficiencia o tratamiento inmunosupresor.
- Enfermedad autoinmune.
- Enfermedad inflamatoria o infecciosa de carácter crónico.

En la visita inicial, o tras confirmar el diagnóstico, se realizó anamnesis a todos los pacientes y se solicitó un estudio de extensión consistente en exploración física completa, hemograma, velocidad de sedimentación globular, bioquímica general, urinoanálisis, radiografía simple de tórax, ecografía abdominal y estudio de sangre oculta en heces.

3.2. Variables demográficas, clínicas e histopatológicas

La clasificación y agrupamiento de pacientes se hizo considerando una serie de variables clínicas e histopatológicas que se describen a continuación:

3.2.1. Variables demográficas y clínicas

- **Variables demográficas:** edad, sexo y procedencia geográfica.
- **Extensión de la enfermedad**
 - Metástasis: se evaluó la presencia o no de metástasis tanto linfáticas como viscerales.
 - No Metástasis.

3.2.2. Variables histológicas

- **Índice de Breslow** (Figura 9): Para describir el espesor de Breslow se utilizó la última clasificación propuesta por la AJCC:

- $\leq 1,00$ mm.
- 1,01 - 2.00 mm.
- 2,01 - 4.00 mm.
- $> 4,00$ mm.

Por operatividad, se consideraron dos grupos en función del grosor, a saber:

- Espesor menor o igual a 1 mm (≤ 1 mm).
- Más de 1 mm de espesor (> 1 mm).

- **Tipo histológico:**

- Melanoma “*in situ*” (MIS).
- Melanoma de extensión superficial (MES).
- Melanoma nodular (MN).
- Melanoma lentiginoso acral (MLA).
- Léntigo maligno melanoma (LMM).
- Melanoma desmoplásico (MD).

En los estudios de susceptibilidad frente al melanoma se realizaron analizando las dos variantes más frecuentes MES y MN.

- **Ulceración de la superficie tumoral:**

- Sí.
- No.

3.3. Variables experimentales

- Antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B)

- Epítomos HLA-Bw4
- Alelos HLA-C y alotipos en función del dimorfismo en la posición 80 de la hélice $\alpha 1$ (Asn80/Lys80).
- Alelos y genotipos HLA-E
- Alelos HLA de clase II (HLA-DR y -DQ)
- NKR y marcadores de activación de linfocitos T en sangre periférica.
- Expresión de receptores KIR2D en células T CD8⁺ y células NK de sangre periférica.

4. PROTOCOLO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de sangre fueron recogidas mediante punción venosa y antes de la exéresis completa de la lesión tumoral, y coleccionadas en tubos anticoagulados con EDTA o con ácido-citrato-dextrosa (ACD) (Becton Dickinson, Mountain View, CA), según el método a seguir. Posteriormente, una alícuota de sangre periférica fresca anticoagulada con EDTA fue utilizada directamente para el análisis de citometría, otra alícuota de sangre anticoagulada con ACD se utilizó para aislamiento de células mononucleares para su posterior análisis de microlinfocitotoxicidad y otra anticoagulada con EDTA guardada a -80°C hasta su uso para la extracción de ADN y posterior genotipaje de HLA. En paralelo, muestras de sangre de voluntarios sanos elegidos al azar fueron también obtenidas, procesadas, y utilizadas como controles.

4.1. BIOPSIA SELECTIVA DEL GÁNGLIO CENTINELA

En la mayoría de los tumores sólidos, como los melanomas, las metástasis ganglionares no se reproducen al azar en cualquier ganglio de la cadena linfática, sino que ocurren de forma ordenada y secuencial y, cuando se producen, la primera metástasis se localiza en el primer ganglio (ganglio centinela), localizado entre el tumor primario y el área ganglionar correspondiente (Figura 29).

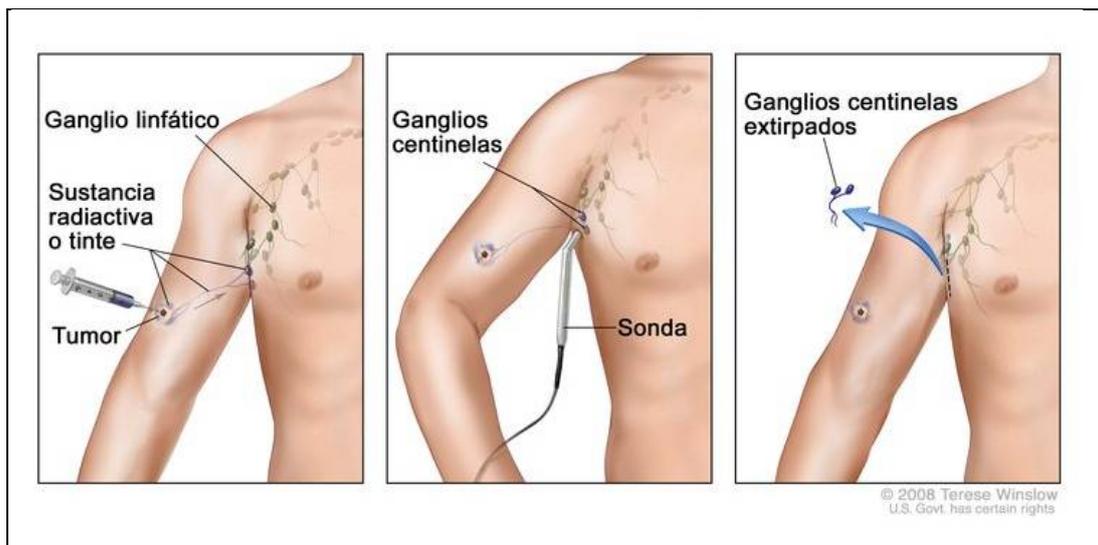


Figura 29. Biopsia del ganglio centinela. Una sustancia radiactiva o un tinte azul se inyecta cerca del tumor (primer cuadro). El material inyectado se localiza visualmente o con un dispositivo que detecta radiactividad (cuadro del centro). Los ganglios centinelas (los primeros ganglios que absorben el material) se extraen y estudian para verificar la presencia de células cancerosas (último cuadro). La biopsia del ganglio linfático centinela se puede hacer antes o después de extirpar el tumor. (Winslow T, 2008. National Cancer Institute)

Para poder identificar el “ganglio centinela”, en primer lugar se deberá localizar anatómicamente el lugar donde se encuentran los ganglios regionales correspondientes a la zona de piel donde se localiza el tumor. Para ello, se utiliza un procedimiento denominado “mapeo linfático con radioisótopos o linfografía radioisotópica”. Brevemente, se inyecta en la piel un coloide marcado con Tecnecio 99 [Tc99] alrededor de la cicatriz que dejó el tratamiento quirúrgico de la lesión tumoral. Tras incorporarse a la circulación linfática, el coloide-Tc99 circula y llega al primer grupo de ganglios (estación linfática regional) señalando su lugar anatómico mediante la radiación que será captada por un equipo especialmente diseñado para un rastreo corporal completo (cámara gamma).

El ganglio centinela será el que tenga mayor radioactividad. Esto se mide con un contador manual de radiación. Una vez identificado, el ganglio centinela será extirpado y enviado a un patólogo experimentado para su examen cuidadoso, a través de múltiples cortes y tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para detectar si existen células de melanoma en el ganglio (metástasis) aún en cantidades muy pequeñas.

4.2. Extracción de ADN y amplificación

El ADN genómico fue extraído de leucocitos totales de sangre periférica mediante el método de Proteinasa K, previamente descrito por Kawasaki et al. Alternativamente, el ADN genómico también fue extraído mediante el kit QIAamp DNA blood Midi, siguiendo las instrucciones del proveedor (Qiagen, Hilden, Germany). Para evitar contaminaciones se habilitaron dos localizaciones, una dedicada a las manipulaciones pre-PCR y otra para las manipulaciones con productos de amplificación. En segundo lugar, siempre se utilizaron guantes desechables y tubos de plásticos estériles o autoclavados en la manipulación del ADN.

El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría y utilizado para su amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa ((PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador 9600 (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). La calidad del producto de PCR fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.1. Protocolo de extracción de ADN

Se utilizó el método de extracción con el kit QIAamp DNA Blood Midi (QIAGEN, Hilden, Alemania), mediante el cual se obtiene ADN altamente purificado. El proceso de extracción se detalla a continuación: Se depositan 2 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA, sin que el número de leucocitos exceda de 2×10^7 , en un tubo FalconTM de 15ml a la que se le añade 200µL de proteasa Qiagen y 2,4mL de buffer AL. La mezcla se agita y se incuba en un baño a 70° durante al menos 10 minutos para provocar la lisis celular. Tras la incubación se añaden 2mL de etanol al 96% y se agita hasta conseguir una mezcla homogénea, tras lo que la mitad del volumen se traspasa a una columna en un tubo de 15ml y se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. Se descarta el filtrado y se repite el proceso con el resto de la mezcla. Se añaden 2 ml de buffer AW1 a la columna y se centrifuga a 5000 rpm durante 1 minuto. Se añaden 2 ml de buffer AW2 a la columna y se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos para eliminar cualquier resto de buffer AW2 de la columna antes de la elución del ADN y el etanol residual, que interferiría con el proceso de

PCR conduciendo a la obtención de falsos negativos. La columna se traspasa a un tubo de 15ml nuevo, se le añaden 300µL de buffer de elución (buffer AE) y se incubaba a temperatura ambiente durante 5 minutos tras lo que se centrifuga a 5000 rpm durante 2 minutos para obtener el ADN eluido a una concentración entre 90-150 µg/ml.

4.3. Tipaje de HLA-A y HLA-B

Las técnicas utilizadas para el tipaje de HLA fueron distintas en función de los loci que se estudiaron. Los tipajes de HLA-A y HLA-B fueron realizados mediante un test estándar de microlinfocitotoxicidad (Terasaki et al 1974). Los sueros utilizados para la determinación antigénica fueron obtenidos en nuestro laboratorio (antisueros locales bien definidos) y aportados por los laboratorios que participan en los Talleres de histocompatibilidad españoles. Alternativamente, también se utilizaron anticuerpos comerciales bien definidos y placas comerciales de tipaje serológico. Cuando fue necesario por no disponer de células o para confirmaciones del tipaje se realizó el tipaje de HLA-A y HLA-B mediante PCR usando primers específicos de secuencia (PCR-SSP, del inglés, *sequence specific primers*) de One Lambda, Los Angeles, CA, USA.

A continuación se describen brevemente ambas técnicas.

4.3.1. Técnicas serológicas de microlinfocitotoxicidad o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

Este procedimiento se basa en la citólisis mediada por anticuerpos específicos en presencia de complemento (Terasaki et al., 1974). Durante todo el estudio, los reactivos utilizados para tipaje se sometieron previamente a controles de calidad y fueron seleccionados en función de la misma. Para asegurar la interpretación de resultados, se trabajó con muestras cuya viabilidad celular fuese superior al 90%.

El tipaje HLA serológico se realizó en células mononucleares o linfocitos T y B de sangre periférica aislados por gradientes de densidad. El gradiente utilizado fue Lymphoprep, que es un polímero de carbohidrato de alto peso molecular, con el cual se pueden preparar diluciones para conseguir diferentes densidades. Con este

procedimiento, que utiliza una densidad ajustada a 1.077 g/mL, las células mononucleares de sangre periférica se separan bien de los hematíes y granulocitos.

4.3.1.1. Reactivos e instrumental en microlinfocitotoxicidad

- Azul Tripán (Sigma Chemical, St. Louis, MO), en solución de ClNa (Panreac, Montplet y Esteban SA, Barcelona) al 0.9%.
- Complemento de conejo (Diagnóstica Longwood, Zaragoza). Se utilizaron lotes de reserva previamente evaluados para su capacidad lítica.
- Eosina A al 5% (Merck, Darmstadt, Alemania). La eosina es un colorante vital, que penetra en las células únicamente si la membrana celular está dañada, pero no es capaz de penetrar en las células que presentan la membrana intacta.
- Formaldehído 35-40% (Merck) con pH entre 7.2-7.4 ajustado con NaOH 1N (Sigma).
- Medio de separación celular Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega).
- Medio de cultivo RPMI1640 (GibcoBRL, Life Technologies, Pasley, Escocia).
- Parafina líquida (Merck), para formar el microambiente de la placa de Terasaki.
- Placas de Terasaki (One Lambda).
- Solución madre de azul tripán al 0.5%. Filtrada con papel Whatman 3MM (Whatman International Mardstone, UK).
- Solución madre de ClNa 4.25M.
- Suero salino fisiológico (Braun, Dexon, Barcelona).
- Sueros anti-HLA de producción propia, de intercambios de laboratorios nacionales e internacionales, y de procedencia comercial; entre estos últimos se utilizaron Peel-Free (USA), One Lambda (USA), Biotest

(Alemania), Fresenius (Alemania), Inmunohospitalar (Madrid), Diagnóstica Longwood (Zaragoza), Gull (Bélgica), Inmunoanalítica (Madrid), Reactiva (Barcelona), Cultek (UK).

- Cámara de Neubauer (Exacta, Super-Rior, Alemania).
- Dispensador automático de sueros (One Lambda Inc, Canoga Park, CA).
- Dispensador automático de parafina líquida (One Lambda).
- Microdispensadoras Hamilton de un canal, multicanales y con jeringa de dispensación acoplada (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA).
- Microscopio invertido de luz visible con contraste de fases (Leitz, Wetzlar, Alemania), para la lectura de las placas de Terasaki.
- Microscopio ordinario de contaje celular (Leitz).

4.3.1.2. Separación celular y obtención de células mononucleares de sangre

Para la separación de células mononucleares se siguió la técnica descrita por Boyum (1968).

A continuación, la muestra se diluyó a 1/2 con suero salino fisiológico (CINa 0.9%) y se depositó sobre un volumen de Lymphoprep equivalente a 1/3 del volumen total de sangre ya diluida. Ésta se dejó caer suavemente por las paredes del tubo evitando la mezcla con el medio de separación. A continuación, se centrifugó a 600 G durante 25 minutos a 24°C en centrifuga (Heraeus Instruments, Osterode, Alemania). Seguidamente, el anillo de células mononucleares, formado en la interfase entre el plasma y el medio de separación, se recuperó con una pipeta pasteur (LP Italiana Spa, Milan, Italia). Las células se lavaron 3 veces, con suero salino fisiológico-RPMI1640 al 10% y centrifugación a 400 G durante 5 minutos.

Las células obtenidas se resuspendieron rutinariamente en medio de cultivo RPMI1640, ajustándose a la concentración adecuada mediante recuento y comprobación de la viabilidad celular, con azul tripán en cámara de Neubauer. Para tipaje HLA, la concentración de linfocitos se ajustó a 3×10^6 células/mL.

4.3.1.3. Técnica de microlinfocitotoxicidad

Los sueros, con reactividad frente a moléculas HLA de clase I, se tenían predispensados en placas Terasaki de 60 y/o 72 micropocillos de reacción y congelados a -80°C con aceite de parafina en cada pocillo, para proteger los sueros de la congelación y para prevenir su evaporación.

Los sueros con los que se elaboraron las placas de tipaje HLA de clase I se seleccionaron de manera que todos fuesen de especificidad conocida, a partir de sueros propios o de intercambio, a través de Talleres de Histocompatibilidad nacionales o internacionales. Los sueros comerciales fueron sistemáticamente evaluados para confirmar su especificidad. Los antisueros dispuestos en la placa de tipaje permitían tipar todas las especificidades serológicas reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Si, para determinar una especificidad concreta de clase I, se disponía de sueros monoespecíficos, se utilizaron al menos 2 sueros de la misma especificidad; si, por el contrario, sólo disponíamos de sueros poliespecíficos se utilizaron al menos 3 sueros diferentes en los que las especificidades adicionales no se solaparon entre sí.

- Un microlitro de la suspensión de células (a 3×10^6 células/mL) se dispensó en cada micropocillo de la placa correspondiente. Para ello, se utilizó una microdispensadora Hamilton de un canal, evitando el arrastre de pocillos anteriores y asegurándose de que el suero específico y las células problema se mezclasen bien.
- A continuación, las placas se incubaron a 22°C durante 30 minutos.
- Transcurrido este tiempo, se añadieron 5 µL del complemento de conejo a cada micropocillo, con microdispensadora Hamilton multicanal de 6 vías, y las placas se incubaron a 22°C durante 1 hora.
- A continuación, se añadieron 3 µL de eosina A al 5% en cada micropocillo, incubando durante 5 minutos y, posteriormente, añadiendo 9 µL de formaldehído al 35-40%.
- Las placas se mantuvieron un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, para dejar que las células se depositasen al fondo del micropocillo y se

procedió a su lectura en un microscopio invertido de contraste de fases. Las células vivas aparecieron pequeñas, brillantes y refringentes, mientras que las células muertas aparecieron de mayor tamaño y de color rojo debido a la entrada de eosina en el interior de las mismas.

4.3.2. PCR-SSP para genotipaje HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1

Consiste en la amplificación de ADN con primers de secuencia específica, por lo que se usa para cada locus de HLA un conjunto de primers o cebadores cuyas secuencias discriminan las diferentes variantes que puede presentar el locus, de tal forma que solo se produce la reacción de amplificación cuando el ADN contiene el alelo que corresponde al grupo de primers de la reacción (Figura 30).

4.3.2.1. Material y reactivos.

- ADN genómico, de concentración entre 90-150 µg/ml.
- Placas de tipaje Micro SSPTM (One Lambda, Canoga Park, California, Estados Unidos), que contienen los primers o cebadores de oligonucleótidos específicos de la secuencia para la amplificación de los alelos de HLA y del gen de la β-globina humana liofilizados y un par de primers que corresponden a los cebadores de la hormona de crecimiento humana que sirven como control interno de la amplificación para cada PCR.
- D-Mix(One Lambda, Canoga Park, California, Estados Unidos), que contiene mezcla de dNTPs, gelatina, KCl, MgCl₂, Tris-HCl pH 8.3, glicerol, y colorante de corrida.
- Taq ADN Polimerasa (Roche Diagnostic, Basilea, Suiza).
- Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X (BIO-RAD, Hercules, California).
- Agarosa low melting point (Sigma- Aldrich, St. Louis. Missouri).
- Bromuro de etidio.

4.3.3. Técnica de tipaje por PCR-SSP

La cantidad de solución de amplificación de la PCR (D-mix), Taq DNA Polimerasa y ADN varió en función de la complejidad del locus a tipar tal y como se recoge en la Tabla 10.

Para el tipaje de alelos del locus HLA-A, 30 μL de ADN problema se añadieron a 270 μL de la solución de amplificación. A la mezcla de D-mix- ADN se le adicionó 1,5 μL de Taq ADN Polimerasa. Para el tipaje de alelos del locus HLA-B se utilizaron 60 μL de ADN de la muestra, 540 μL de D-mix y 3 μL de Taq ADN polimerasa.

Tabla 10. Cantidades necesarias de reactivos para la amplificación de los alelos de los loci HLA-A, -B, -DRB1, DQB1 por cada muestra de ADN

	HLA-A	HLA-B	DRB1, DQB1
D-mix	270 μL	540 μL	360
Taq ADN Polimerasa	1,5 μL	3 μL	2,2

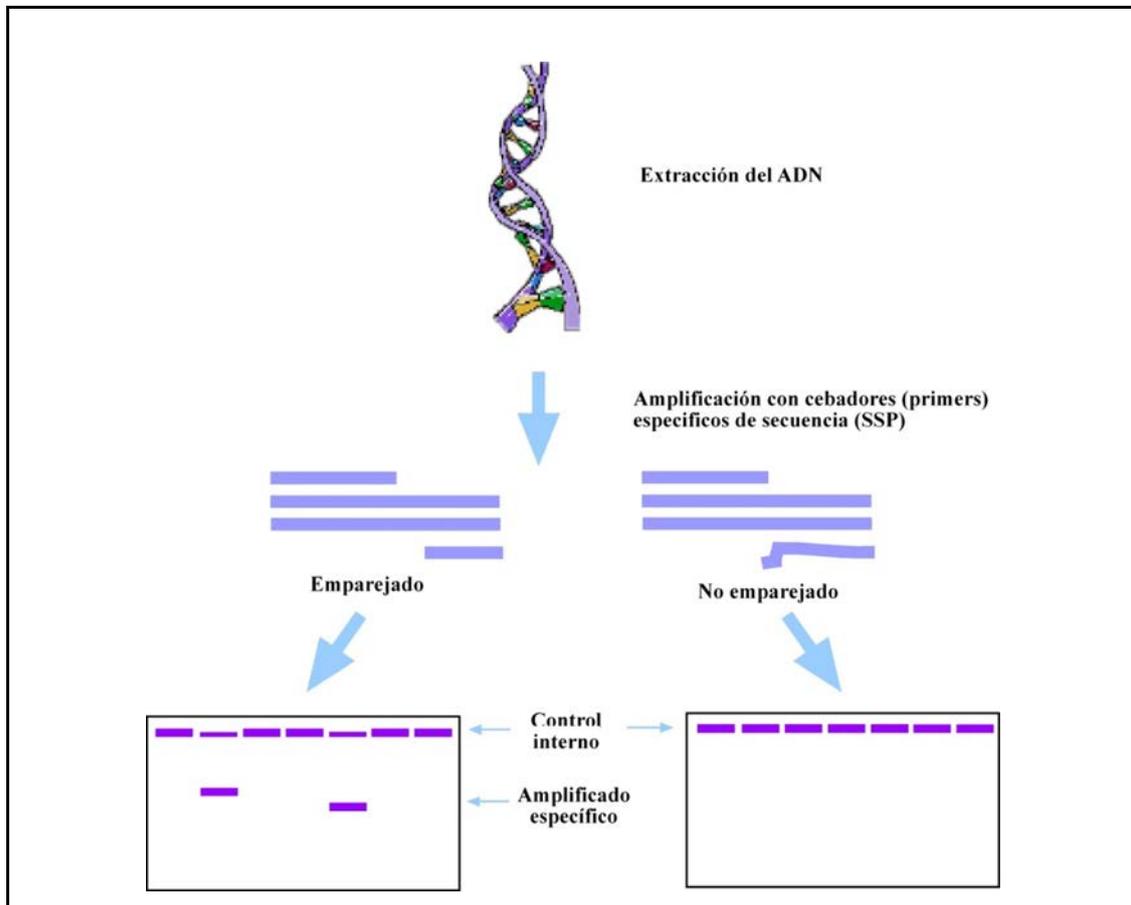
Tras agitar la mezcla, se dispensaron 10 μL en cada pocillo de la placa Micro SSPTM y se llevó a un termociclador 9600 Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) o Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos), para realizar el proceso de amplificación de ADN. Las condiciones de amplificación se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de amplificación de los alelos de los loci HLA-A, -B, -DRB1, DQB1

Nº ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	96°C	130 segundos
	2	63°C	60 segundos
9	1	96°C	10 segundos
	2	63°C	60 segundos
20	1	96°C	10 segundos
	2	59°C	50 segundos
1	3	72°C	30 segundos
	1	4°C	Mantener hasta su uso

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% para lo que se utilizó 30 ml de Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, 0,75g de agarosa y 10 μ L bromuro de etidio.

Figura 30. Esquema del tipaje de HLA mediante PCR-SSP



4.4. Genotipaje de HLA-C

El genotipaje de HLA-C fue realizado mediante el kit Dynal RELI, en presencia de oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO, del inglés, *sequence-specific oligonucleotide*). El genotipaje SSO se realizó en un AutoRELI 48 (Dynal Biotech). El nivel de resolución mediante PCR-SSO reversa permitió discriminar el dimorfismo en posición 80 de la hélice- α 1. Alternativamente, para resolver ambigüedades el genotipaje de HLA-C también fue realizado mediante PCR-SSP.

4.4.1. PCR-SSO reversa

Este método se basa en tres procesos: amplificación del ADN de una región específica del locus HLA-C mediante PCR, hibridación del amplificado con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica inmovilizadas en una membrana de nylon y la detección del producto amplificado unido a la sonda mediante la aparición de color (Figura 31).

Para realizar el tipaje de alelos de HLA-C mediante la técnica de PCR-SSO reversa, se utilizó el kit HLA-C Dynal RELI-SSO (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos).

El material utilizado y los pasos seguidos para la realización de esta técnica se resumen a continuación

4.4.1.1. Material y reactivos

- Mezcla principal HLA-C: es una solución de Tris- HCL que contiene glicerol al 30%, KCL 100mM, dATP, dCTP y dGTP a 400uM, dUTP 800uM, cebadores biotinilados (0,5 uM), AmpliTaq® (polimerasa Taq) 100u/ml y azida sódica al 0,05% como conservante.
- Bandas de tipificación HLA-C.
- Solución de MgCl₂ al 6,0 mM con ProClin® 300 al 1% como conservante
- Solución de desnaturalización con EDTA al 3%, hidróxido de sodio al 1,6% y azul de timol.
- Solución de fosfato sódico con NaCl, EDTA y ProClin®150 al 1,0% como conservante (concentrado SSPE).
- Solución de dodecil sulfato sódico al 20% con ProClin®150 al 1,0% como conservante (concentrado SDS).
- Conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) en una solución ACES con NaCl y ProClin® 150 al 1,0% como conservante.
- Solución de citrato con un 0,01% de H₂O₂ y 0,1% de ProClin® 150 al 1,0% como conservante (sustrato A).

- Solución de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) al 0,1% en dimetilformamida (DMF) al 40% (sustrato B).
- Solución de citrato de sodio.

Los pasos seguidos para el tipaje de HLA-C por PCR-SSO reversa fueron los siguientes:

4.4.1.2. Reacción de amplificación

La mezcla de los componentes para la PCR se preparó en el momento de la realización de la técnica para el número total de muestras a analizar, multiplicando el volumen de cada componente de la mezcla por el número de muestras a analizar más dos. A cada tubo de PCR se le añadió la mezcla de reactivos más el ADN problema, en las cantidades reseñadas en la Tabla 12.

El ADN utilizado fue el extraído según se ha descrito en el apartado 6, obteniendo una concentración entre 90-150 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 12. Volumen de los reactivos utilizados en la amplificación de los locus HLA-C	
Componentes en la PCR	Volumen
Solución MgCl_2 al 6,0 mM	15 μL
Mezcla principal	30 μL
ADN	15 μL

Las muestras una vez preparadas se introdujeron en un termociclador 9600 Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) o Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) donde se llevó a cabo el proceso de amplificación con las condiciones descritas en la Tabla 12.

El proceso de amplificación se produjo tal y como se describe a continuación: La mezcla de reactivos para PCR que contiene la muestra de ADN se calienta a 95°C , lo que separa el ADN de doble hélice y expone las secuencias complementarias a la de los cebadores. Al enfriarse la mezcla, los cebadores biotinilados se alinean con las secuencias que reconocen. La Taq (polimerasa recombinante termoestable) extiende, en presencia de un exceso de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), los cebadores

alineados a las secuencias complementarias hasta producir una secuencia de ADN biotinilado denominada amplicón. Este proceso se repite durante 35 ciclos en cada uno de los cuales se duplica la cantidad de ADN con la secuencia buscada (Tabla 13).

Nº ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
35	1	95°C	15 segundos
	2	60°C	45 segundos
	3	72°C	15 segundos
1	1	72°C	5 minutos
1	1	4°C	-

4.4.1.3. Reacción de hibridación

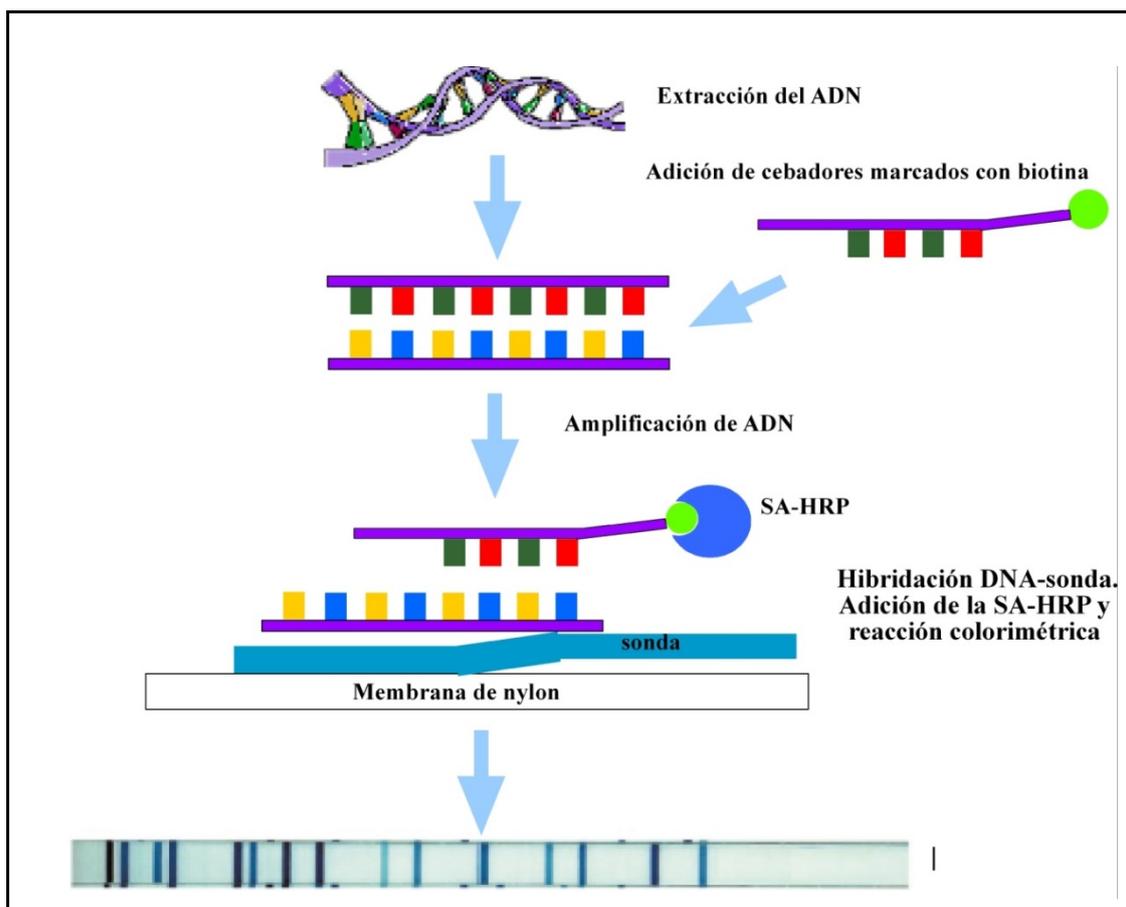
Tras el proceso de amplificación por PCR, los amplicones se desnaturalizaron químicamente para obtener ADN sencillo para lo que se añadieron 60 µL de la solución de desnaturalización y se incubaron durante al menos 10 minutos.

En una bandeja de 48 pocillos, se colocaron las tiras de tipificación de HLA-C con 60 µL del ADN desnaturalizado de cada muestra. La bandeja se colocó en un equipo Dynal AutoRELI™ lo que permitió automatizar el proceso, que consistió en añadir el tampón de hibridación e incubar durante 30 minutos a 50° C con agitación constante. Tras la incubación se aspiró el tampón de hibridación y se lavó 2 veces con tampón de lavado. Después, se añadió la solución de conjugado de trabajo (tampón de lavado y estreptavidina) y se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se procedió a la aspiración de la solución de conjugado de trabajo, al lavado de las muestras dos veces con tampón de lavado y a la adición del tampón de citrato e incubación durante 5 minutos. Para terminar se aspiró el tampón de citrato y se lavó dos veces con agua desionizada.

4.4.1.4. Reacción de detección

Una vez concluido el proceso de hibridación se obtuvieron las tiras con distintas bandas de color azul y con distinta intensidad de color según la hibridación que se había producido entre las sondas de oligonucleótidos de secuencia específica y el ADN problema.

Figura 31. Esquema del tipaje de HLA-C mediante PCR-SSO reversa



La lectura de las tiras se realizó mediante un escáner y la interpretación de los resultados se hizo con el software de interpretación de tiras Dynal RELI™ SSO.

El estudio del genotipo HLA-C de los individuos estudiados permitió clasificar los alelos de HLA-C en función del dimorfismo que presentan en la posición 80 de la hélice- α . Así pudimos clasificar los alelos HLA-C en dos grupos:

- Grupo C1: constituido por los alelos HLA-C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*14 y C*16 que presentan el aminoácido asparagina en la posición 80 de la hélice- α 1.
- Grupo C2: constituido por los alelos HLA-C*02, C*04, C*05, C*06, C*15, C*16:02, C*17 y C*18 que presentan el aminoácido lisina en la posición 80 de la hélice- α 1.

El estudio de los alelos HLA-C permitió clasificar a los pacientes y controles en 3 grupos:

- C1/C1: homocigotos para alelos de HLA-C del grupo C1.
- C2/C2: homocigotos para alelos de HLA-C del grupo C2.
- C1/C2: heterocigotos para alelos de HLA-C de ambos grupos C1/C2.

4.5. Genotipaje de HLA-E

El genotipaje HLA-E se realizó mediante secuenciación. Para ello se amplificó la secuencia completa del exón 2, intrón 2 y exón 3 del gen HLA-E, utilizando un primer 5´específico E25´: TGTGAATTCTCTACCGGGAGTAGAGAGG y un primer 3´-específico E33´: AGCCCTGTGGACCCTCTT (Gómez-Casado et al. 1999). Los productos de PCR fueron purificados con el kit de extracción Qiaquick gel (Qiagen, Hilden, Germany) y se secuenciaron utilizando el kit ABI PRISM® BigDye® en el secuenciador ABI Prism 377 (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Los primers de secuenciación fueron los mismos utilizados para la amplificación.

4.6. Citometría de flujo

Los linfocitos de muestras de sangre periférica fueron teñidos añadiendo 10 μ L de cada AcMo en una combinación apropiada a 100 μ L de sangre total, incubando durante 10 minutos a Tª ambiente en la oscuridad, e incubando con 3 mL de solución de lisis durante 5 minutos. Las muestras marcadas fueron centrifugadas a 355 G durante 5 minutos a 4°C, lavadas con solución salina y finalmente resuspendidas en 0.5 mL de PBS (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France).

Un total de 20.000 linfocitos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CELL QUEST (Becton Dickinson), y los datos fueron analizados mediante el programa PAINT-A-GATE (Becton Dickinson). El análisis se realizó sobre los linfocitos, definidos por tamaño y granularidad (>96% CD45 y <1% CD14).

En el análisis de las subclases de linfocitos, el término de células T CD8 que expresan receptores NK fue utilizado para todas las células T CD3⁺CD8⁺bright que expresan los receptores CD56, CD57, CD94, CD161, CD158a/h o CD158b/j, y la población de células NK estudiada fue definida por el fenotipo CD3⁻CD56⁺. No hay datos sobre linfocitos T CD8 y células NK CD56 que expresan los receptores CD158a/h o CD158b/j en 2 controles de 39 y 3 pacientes de 41.

Se evaluó la densidad de expresión de marcadores en membrana analizando los posibles cambios de la intensidad de fluorescencia, lo cual fue expresado como Intensidad Media de Fluorescencia (IMF), emitida por los receptores CD158a/h/h o CD158b/j/j sobre linfocitos T CD8⁺CD28⁻ y células NK CD56⁺,

4.7. Anticuerpos monoclonales

Los estudios de citometría se realizaron en presencia de los anticuerpos monoclonales (AcMo): anti-CD45 (clon 2D1, IgG1) y anti-CD8 (clon SK1, IgG1) conjugados con PercP; anti-CD14 (clon M0P9, IgG2b) y anti-CD3 (clon SK7, IgG1) conjugado con APC; anti-CD56 (clon NCAM 16.2, IgG2b) y anti-CD57 (clon HNK-1, IgM) conjugado con FITC; y anti-HLA-DR (clon L243, IgG2a) conjugado con PE, todos ellos suministrados por Becton Dickinson (San Jose, CA); anti-CD28 (clon CD28.2, IgG1) conjugado con FITC; y anti-CD158a/h/h (clon EB6, IgG1), anti-CD158b/j/j (clon GL183, IgG1), anti-CD28 (clon CD28.2, IgG1) y anti-CD94 (clon HP-3B1, IgG2a) conjugados con PE, fueron suministrados por Immunotech (Marseille, France); y anti-CD161 (clon DX12, IgG1) conjugado con PE procedente de PharMingen (San Diego, CA). Se utilizaron también anticuerpos de isotipo apropiados para descartar inespecificidades (Tabla 14)

Tabla 14. Anticuerpos monoclonales para el estudio de citometría de flujo

Molécula reconocida	Células portadoras	Clon	Fluorocromo
CD3	T	clon SK7, IgG1	APC
CD8	Tsub, NK	SK1, IgG1	PerCP
CD14	Mo, M θ , Gr	M θ P9, IgG2b	APC
CD28	T	28.2, IgG1	FITC
CD28	T, Timocitos, CP	28.2, IgG1	PE
CD45	Panleucocitario	2D1, IgG1	PerCP
CD56	NK, Tsub, TN, LM, LGL	NCAM 16.2, IgG2b	FITC
CD57	NK, T	HNK-1, IgM	FITC
CD94	NK, T	HP-3B1, IgG2a	PE
CD158a/h	Células NK, Tsub	EB6, IgG1	PE
CD158b/j	Células NK, Tsub	GL183, IgG1	PE
CD161	NK, subT, Timocitos	DX12, IgG1	PE
HLA-DR	B, Mo, M θ , cél*	L243, IgG2a	PE

CD: Cluster de diferenciación; cél*, células activadas; CP, células plasmáticas; Gr, Granulocitos; LM: Leucemia mieloide; LGL, linfocitos grandes granulares; Mo, Monocitos; M θ , Macrófagos; NK, células *Natural Killer*; T, linfocitos T; Tsub, subpoblación T; TN: Tejido neural.

4.7.1. Procedimiento de marcado celular: Inmunofluorescencia directa

El método que se usó para el estudio fue la técnica de inmunofluorescencia directa. Para ello se dispensaron 100 μ L de sangre total anticoagulada con EDTA en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm. A cada tubo se añadieron 10 μ L de cada uno de los AcMos conjugados con fluorocromo, según se recoge en la Tabla 15. Tras agitación se incubaron durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y, posteriormente se añadieron 3 ml de solución de lisis y fijación (BD FACS™ Lysing Solution, BD). Tras una nueva incubación en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron 5 minutos a 400xg (1500 rpm) y a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón celular del fondo del tubo se resuspendió con solución de lavado (PBS, buffer fosfato salino, pH: 7.4, BD FACSFlow™ Sheat Fluid, BD), repitiendo esta operación dos veces. Por último, las células se resuspendieron en 500 μ L de PBS.

En paralelo se procesó un tubo con los controles de isotipo de cada una de las inmunoglobulinas conjugadas para cada uno de los fluorocromos que componen el **marcaje**.

Tabla 15. Combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizadas en el estudio de poblaciones celulares

PerCP	PE	FITC	APC	Poblaciones analizadas
CD45	-	-	CD14	Leucocitos, Linfocitos, monocitos
CD8	CD3	CD28	HLA-DR	T CD8+DR+ T CD8+CD28+DR+ T CD8+CD28-DR+
CD8	CD3	CD57	CD28	T CD8+CD57+ T CD8+CD28+CD57+ T CD8+CD28-CD57+
CD8	CD3	CD56	CD28	T CD8+CD56+ T CD8+CD28+CD56+ T CD8+CD28-CD56+
CD8	CD3	CD28	CD94	T CD8+CD94+ T CD8+CD28+CD94+ T CD8+CD28-CD94+
CD8	CD3	CD28	CD161	T CD8+CD161+ T CD8+CD28+CD161+ T CD8+CD28-CD161+
CD8	CD3	CD28	CD158a/h	T CD8+CD28+CD158a/h+ T CD8+CD28-CD158a/h+
CD8	CD3	CD28	CD158b/j	T CD8+CD28+CD158b/j+ T CD8+CD28-CD158b/j+
CD8	CD3	CD56	CD158a/h	NK CD56+CD158a/h+
CD8	CD3	CD56	CD158b/j	NK CD56-CD158b/j+
Control isotipos (IgG1/IgG2a/IgG1)				Control de fluorescencia

CD: Cluster de diferenciación; NK, células *Natural Killer*; T, linfocitos T.

4.7.2. Estandarización del citómetro de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD), equipado con un láser de argón de 488 nm y un láser diodo rojo de 633 nm, capaz de analizar 6 parámetros simultáneamente para cada una de las células adquiridas. Los componentes fotoeléctricos del citómetro se ajustaron utilizando el software CellQuest™ y los calibradores adecuados (CALIBRITES, microesferas marcadas con FITC, PE, PerCP, APC y sin marcar, BD). La IMF de las microesferas marcadas con los distintos fluorocromos se calculó diariamente y con cada muestra de estudio se adquirió una suspensión de calibradores en PBS, con el fin de controlar la estabilidad fotoeléctrica del citómetro

4.7.3. Adquisición y análisis de muestras

Los parámetros FSC y SSC, que determinan el tamaño y la granularidad celular respectivamente, vienen expresados en escala lineal. Las distintas fluorescencias FL1 (FITC), FL2 (PE), FL3 (PerCp) y FL4 (APC) se expresan en escala logarítmica. La adquisición de las muestras se realizó utilizando el software CellQuest™. El análisis se realizó con el software PAINT-A-GATE™, ambos de Becton Dickinson.

4.7.3.1. Sistemática de adquisición de las muestras

Una vez concluido el proceso de marcado con AcMo, las muestras se diluyeron en PBS hasta conseguir una velocidad de adquisición de entre 200-600 células por segundo. Del primer tubo de marcaje se adquirieron hasta un total de 50.000 células mononucleares de sangre periférica (CMSP), que se utilizaron para crear una ventana o “gate” de adquisición de células con morfología linfomonocitaria. Esta ventana se creó a partir de los parámetros FSC/SSC. Una vez seleccionada esta población, se procedió a la adquisición en el resto de tubos, hasta conseguir 60.000 células dentro del “gate” de adquisición.

4.7.3.2. Cálculo de los porcentajes y valores absolutos celulares y de la Intensidad Media de Fluorescencia.

Para calcular el porcentaje e IMF de una molécula dentro de una subpoblación de linfocitos determinada, se realizó una primera ventana de análisis (R1) que englobaba las células que por su distribución para los parámetros FSC/SSC tenían aspecto linfocitario de acuerdo con los parámetros de tamaño y granularidad (Figura 32). Dentro de ellas se distinguieron dos regiones claramente diferenciadas: células positivas para CD3 y CD8 (R2), y células negativas para CD3 y positivas para CD8 (R3), tal como se visualiza en la Figura 32. Dentro de las células CD3+CD8+ se diferenciaban a su vez dos poblaciones (Figura 32), una de células positivas para la molécula CD28 (R4) y otra de células que no expresaban CD28 (R5). Dentro de las células CD3+CD8+, las células CD28- (R5) se expresaban los receptores KIR (Figura 32) y fue dentro de esta población donde se calculó la IMF de CD158a/h y CD158b/j.

Para calcular la intensidad de expresión de una molécula determinada sobre una subpoblación celular particular se utilizó el parámetro Intensidad Media de Fluorescencia (IMF), proporcionado por el programa de análisis PAINT-A-GATE™. La IMF ofrece una estimación de la intensidad de expresión de una molécula sobre la población celular considerada, que es proporcional al número de moléculas detectadas sobre la superficie celular. Para el cálculo de la IMF de las moléculas CD158 se consideró la media del pico que producía el marcador M1 tal como se visualiza en el histograma de la Figura 32.

A partir de los porcentajes obtenidos en el análisis citométrico los valores se calcularon en valores absolutos. Los valores absolutos obtenidos para cada población celular, tanto en pacientes de melanoma como en controles, se representan en las Tablas correspondientes (ver capítulo de Resultados) en forma de valores medios absolutos de cada población.

4.7.3.3. Análisis de los datos obtenidos mediante citometría de flujo

El número total de leucocitos (células $\times 10^{-3}/\text{ml}$) se obtuvo mediante un contador automático Coulter AC• T diff™ (Coulter Corporation, Miami, Florida) y

sirvió para calcular los valores absolutos de cada una de las subpoblaciones celulares estudiadas.

El porcentaje de células que expresaban las moléculas de interés, así como la expresión de dichas moléculas en la superficie celular se obtuvieron tras fijar los límites de fluorescencia con los controles de isotipo correspondientes.

De este modo y usando los porcentajes estimados por citometría de flujo para cada población y teniendo en cuenta el número total de leucocitos, se pudo calcular el número absoluto de células / μ l para cada tipo celular.

Las fórmulas utilizadas para el cálculo de los valores absolutos de poblaciones linfocitarias y sus subtipos fueron respectivamente:

$$\text{Número absoluto de linfocitos} = \frac{\text{N}^\circ \text{ absoluto de leucocitos} \times \% \text{ linfocitos}}{100}$$

$$\text{Número absoluto en población a estudio} = \frac{\text{N}^\circ \text{ absoluto de linfocitos} \times \% \text{ población a estudio}}{100}$$

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos demográficos y los resultados del análisis de HLA y de citometría fueron recogidos en una base de datos Microsoft Access 2.0 (Microsoft Corporation, Seattle, WA). Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

Las frecuencias de los antígenos y alelos HLA fueron estimadas por conteo directo y representan el porcentaje de individuos positivos para un cierto antígeno o alelo. Las frecuencias antigénicas y alélicas fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. La fuerza de las asociaciones fue estimada por la odds ratio (OD). Para detectar diferencias respecto a la edad y sexo, se realizó un test *t*-student desapareado de dos colas y un test χ^2 , respectivamente.

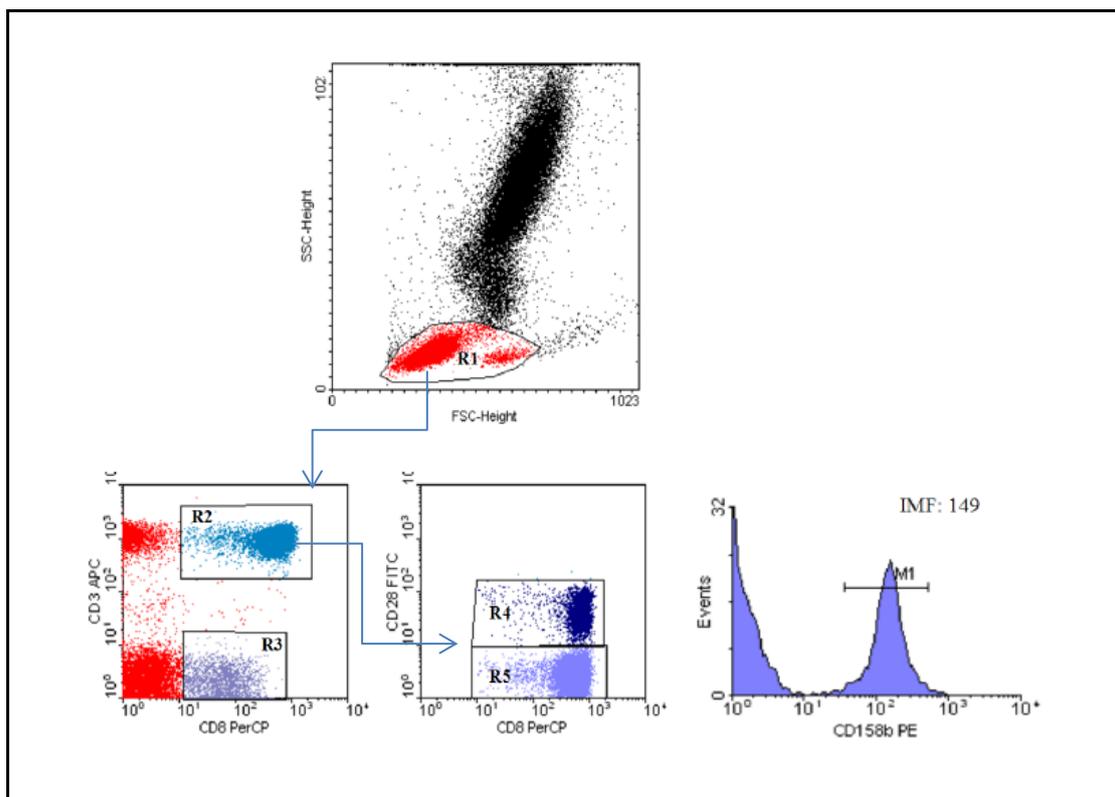


Figura 32. Representación de las ventanas utilizadas para el análisis por citometría de flujo. En la figura se representan los gráficos, con las regiones necesarias para realizar el análisis porcentual de las distintas poblaciones y el histograma utilizado para realizar el análisis de IMF de las moléculas CD158.

Los datos referentes al valor absoluto de linfocitos T y células NK en sangre periférica fueron transformados logarítmicamente. Las diferencias entre el número de linfocitos T, células NK, y la IMF de los receptores KIR estudiados fueron comparadas entre los diferentes grupos de individuos utilizando un análisis ANOVA de una vía complementado con el test post hoc de Bonferroni, y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, cuando fue necesario también se utilizó un test *t*-student apareado o desapareado de dos colas.

Los datos de citometría de flujo fueron expresados como media \pm SEM, y los valores de “p” menores de 0.05 fueron considerados significativos. El valor de “p” corregido (Pc) se obtuvo multiplicando el valor de “p” por el número de antígenos o alelos testados para cada locus de acuerdo con la corrección de Bonferroni (Svejgaard and Ryder 1994).

RESULTADOS

1. SERIES ESTUDIADAS Y SUS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS

El estudio que aquí se presenta se realizó sobre 530 individuos, 174 de ellos eran pacientes con melanoma de diferentes tipos histológicos (Tabla 1x) y 356 individuos sanos compatibles en edad y sexo y del mismo origen étnico. La serie total de pacientes constaba de 121 individuos diagnosticados de MES, 20 de MN, 13 de MLM, 9 de MLA, 10 de MIS y 1 MD. En el momento del estudio se dispuso de datos sobre la presencia o ausencia de metástasis en el ganglio centinela en 105 de los 174 pacientes y, de ellos, en 92 pacientes el ganglio centinela fue negativo. Por otra parte, los pacientes también fueron agrupados atendiendo a la última clasificación de la AJCC: así, de los 174 pacientes 94 presentaban un tumor ≤ 1.0 mm de grosor y 80 un tumor > 1 mm; 31 pacientes presentaban ulceración en la lesión primaria y 136 no presentaban ulceración. No se dispuso de datos sobre ulceración en 7 de los 174 pacientes (Tabla 16).

Tipo histológico del melanoma	Características clínicas del melanoma					
	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
	≤ 1	> 1	No	Sí	No	Sí
	N = 94 (54%) n (%)	N = 80 (46%) n (%)	N = 136 (81.4%) n (%)	N = 31 (18.6%) n (%)	N = 92 (87.6) n (%)	N = 13 (12.4) n (%)
MIS	10 (100)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	-	-
MES	73 (60.3)	48 (39.7)	102 (87.2)	15 (12.8)	74 (87.1)	11 (12.9)
MN	0 (0)	20 (100)	8 (47.1)	9 (52.9)	8 (80.0)	2 (20.0)
MLM	8 (61.5)	5 (38.5)	11 (84.6)	2 (15.4)	5 (100)	0 (0)
MLA	3 (33.3)	6 (66.7)	4 (44.4)	5 (55.6)	5 (100)	0 (0)
MD	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	-	-

Por otro lado, se analizó el locus HLA de clase I no clásico, HLA-E, sobre 100 pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo y 100 individuos sanos. Este

grupo de pacientes constaba de 62 sujetos diagnosticados de MES, 15 de MN, 10 de MLM, 7 de MLA y 6 de MIS. También se dispuso de datos sobre la presencia o ausencia de metástasis en el ganglio centinela en el momento del diagnóstico en 42 de los 100 pacientes y, de ellos, 38 pacientes tuvieron ganglio centinela negativo. De acuerdo con la clasificación AJCC, de estos 100 pacientes, 51 presentaban un tumor con un grosor ≤ 1.0 mm y 49 > 1 mm; respecto a la presencia de ulceración en la lesión primaria de estos 100 pacientes, en 24 se observó ulceración, en 71 no se observó y no se dispuso de datos sobre ulceración en 5 pacientes.

Por otra parte, también se estudió la influencia del locus HLA-C en el repertorio de linfocitos T CD8⁺ y células NK CD56⁺ en sangre periférica de pacientes con melanoma cutáneo y de un grupo control. Este estudio se realizó sobre 41 pacientes con melanoma y 39 individuos sanos. La serie de pacientes se componía de 19 hombres y 22 mujeres de una edad media de 48 años (rango 24-65 años) y la de los controles consistió en 20 hombres y 19 mujeres, con una edad media de 44 años (rango 22-65 años). De los pacientes, 35 individuos estaban diagnosticados de MES, 4 de MLM y 2 de MLA y de todos ellos se dispuso de datos sobre el ganglio centinela en el momento del diagnóstico; de estos, 6 pacientes tuvieron ganglio centinela positivo. Como en los casos anteriores, se clasificó a los 41 pacientes según el grosor y la ulceración del tumor; así, en 27 se observó un tumor ≤ 1.0 mm de grosor, en 14 el tumor tenía > 1 mm y, respecto a la ulceración, 4 pacientes presentaban ulceración en la lesión primaria, 36 pacientes no presentaron ulceración y en uno de ellos no fue posible obtener datos sobre la presencia de ulceración.

2. FRECUENCIA DE ANTÍGENOS HLA-A Y HLA-B EN PACIENTES CON MELANOMA

Los resultados del estudio de frecuencia de los antígenos de histocompatibilidad HLA-A y HLA-B realizados en 401 sujetos del mismo origen étnico, 174 de ellos eran pacientes con melanoma y 227 individuos voluntarios sanos que se utilizaron como grupo control se muestran en las Tablas 1r y 2r, respectivamente.

Como se observa en la Tabla 17, la distribución de los diferentes antígenos HLA-A no difería significativamente entre el total de pacientes diagnosticados de melanoma y el grupo control. Sin embargo, cuando la distribución de los antígenos HLA-A fue examinada considerando los dos subtipos histológicos de melanoma más frecuentes (MES y MN), los resultados mostraron una disminución del antígeno HLA-A1 en pacientes MES comparado con el grupo control (11% vs. 20%, $P = 0.034$, $P_c > 0.05$, OR = 0.49).

Por otra parte, el análisis de los antígenos HLA-B (Tabla 18) reveló una disminución en la frecuencia del antígeno HLA-B62 en el total de pacientes comparado con el grupo control (1% vs. 5%, $P = 0.015$, $P_c > 0.05$, OR = 0.11). Esta disminución del antígeno HLA-B62 también fue observada en el grupo de pacientes MES respecto a los controles (0% vs. 5%; $P = 0.01$, $P_c > 0.05$).

Tabla 17. Frecuencia de antígenos HLA-A en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Antígenos HLA-A	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 227 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
A1	45 (20)	28 (16)	13 (11)^a	5 (25)
A2	113 (50)	75 (43)	51 (42)	8 (40)
A3	44 (19)	34 (20)	23 (19)	4 (20)
A11	29 (13)	22 (13)	16 (13)	4 (20)
A23	13 (6)	9 (5)	8 (7)	0 (0)
A24	40 (18)	41 (24)	31 (26)	4 (20)
A25	6 (3)	5 (3)	4 (3)	0 (0)
A26	17 (8)	13 (8)	9 (7)	2 (10)
A28	20 (9)	18 (10)	16 (13)	0 (0)
A29	32 (14)	29 (17)	20 (17)	3 (15)
A30	27 (12)	30 (17)	23 (19)	3 (15)
A31	12 (5)	5 (3)	5 (4)	0 (0)
A32	16 (7)	10 (6)	7 (6)	2 (10)
A33	8 (4)	7 (4)	4 (3)	1 (5)
A34	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
A66	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A blanco	31 (14)	21 (12)	12 (10)	4 (20)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. El valor de *P* se determinó mediante el test exacto de Fisher. ^a, Pacientes MES vs. controles, *P* = 0.034, *P* < 0.05, OR = 0.49, IC95% = 0.25-0.94

Tabla 18. Frecuencia de antígenos HLA-B en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Antígenos HLA-B	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 227 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
B7	39 (17)	27 (16)	23 (19)	2 (10)
B8	26 (11)	17 (10)	11 (9)	2 (10)
B13	10 (4)	5 (3)	2 (2)	1 (5)
B14	19 (8)	21 (12)	13 (11)	2 (10)
B18	34 (15)	37 (21)	27 (22)	3 (15)
B27	8 (4)	8 (5)	6 (5)	0 (0)
B35	43 (19)	31 (18)	18 (15)	7 (35)
B37	3 (1)	2 (1)	1 (1)	0 (0)
B38	15 (7)	13 (8)	9 (7)	3 (15)
B39	10 (4)	5 (3)	3 (3)	1 (5)
B41	9 (4)	6 (3)	4 (3)	1 (5)
B42	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B44	52 (23)	52 (30)	37 (31)	3 (15)
B45	4 (2)	7 (4)	5 (4)	0 (0)
B47	0 (0)	2 (1)	2 (2)	0 (0)
B49	20 (9)	13 (8)	11 (9)	1 (5)
B50	16 (7)	10 (6)	7 (6)	1 (5)
B51	47 (21)	32 (18)	24 (20)	2 (10)
B52	11 (5)	7 (4)	5 (4)	2 (10)
B53	6 (3)	2 (1)	0 (0)	1 (5)
B55	4 (2)	5 (3)	3 (3)	2 (10)
B56	4 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
B57	8 (4)	8 (5)	3 (3)	2 (10)
B58	6 (3)	1 (1)	0 (0)	1 (5)
B60	15 (7)	11 (6)	9 (7)	2 (10)
B61	5 (2)	7 (4)	6 (5)	0 (0)
B62	11 (5)	1 (1)^a	0 (0)^b	1 (5)
B63	2 (1)	2 (1)	1 (1)	0 (0)
B70	3 (1)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
B71	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B72	0 (0)	3 (2)	2 (2)	0 (0)
B75	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B blanco	21 (9)	11 (6)	9 (7)	0 (0)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. El valor de *P* se determinó mediante el test exacto de Fisher. ^a, Pacientes totales vs. controles, *P* = 0.015, *P*_c > 0.05, OR = 0.11, IC95 % = 0.015-0.89; ^b, MES vs. controles, *P* = 0.01, *P*_c > 0.05

Sin embargo, las significaciones anteriormente observadas en el estudio de los loci HLA-A y HLA-B respecto a la susceptibilidad a la enfermedad no se mantuvieron tras aplicar la corrección de Bonferroni. No obstante, no por ello se debe descartar su posible papel en el melanoma ya que esta corrección es muy conservadora y probablemente con mayor número de pacientes estas diferencias sí serían significativas (Martínez-Clambor, 2012).

Tabla 19. Frecuencia de epítomos HLA-Bw4 y HLA-Bw6 en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Epítomo HLA-Bw	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 227 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
Bw4	179 (79)	137 (79)	97 (80)	16 (80)
Bw6	182 (80)	146 (84)	102 (84)	18 (90)
Genotipo Bw				
Bw4/Bw4	45 (20)	28 (16)	19 (16)	2 (10)
Bw6/Bw6	48 (21)	37 (21)	24 (20)	4 (20)
Bw4/Bw6	134 (59)	109 (63)	78 (64)	14 (70)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular.

El análisis de la influencia de los antígenos HLA-A y HLA-B sobre la susceptibilidad frente a melanoma fue ampliado considerando los epítomos serológicos HLA-Bw4 y HLA-Bw6 (Tabla 19) ya que HLA-Bw4 es el ligando de KIR3DL1. Sin embargo, este análisis no reveló diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control. También fue examinada la frecuencia del polimorfismo de los epítomos HLA-Bw4 y HLA-Bw6 considerando los dos subtipos histológicos de melanoma más frecuentes (MES y MN) pero tampoco las diferencias fueron significativas cuando se compararon estos dos grupos entre sí o con el grupo control.

En un análisis posterior, se clasificaron los pacientes y los controles en tres grupos atendiendo a los alotipos HLA-Bw4 de acuerdo al dimorfismo en posición 80, HLA-Bw4 (Thr80) y HLA-Bw4 (Ile80), según se describe en material y métodos. Como se puede observar en la Tabla 20, la distribución de los diferentes alotipos HLA-Bw4 no difieren significativamente entre pacientes y controles. La distribución de los alotipos y genotipos HLA-Bw4 (Thr80) y HLA-Bw4 (Ile80) también fue examinada considerando los dos subtipos histológicos de melanoma más frecuentes (MES y MN), pero los resultados tampoco mostraron diferencias significativas cuando se compararon estos dos grupos de pacientes entre sí, o cuando ambos grupos de pacientes se compararon con el grupo control.

Tabla 20. Frecuencia de alotipos HLA-Bw4 según el dimorfismo en posición 80 (Thre/Ile) en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Alotipos HLA-Bw4	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 179 n (%)	Total N = 137 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 97 n (%)	MN N = 16 n (%)
Bw4 ^{Thr80}	70 (31)	67 (39)	46 (47)	4 (25)
Bw4 ^{Ile80}	147 (65)	110 (63)	77 (79)	15 (94)
Genotipo Bw4				
Bw4 ^{Thr80/Thr80}	32 (18)	27 (18)	20 (21)	1 (6)
Bw4 ^{Ile80/Ile80}	109 (61)	70 (51)	51 (53)	12 (75)
Bw4 ^{Thr80/Ile80}	38 (21)	40 (29)	26 (27)	3 (19)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular.

3. ESTUDIO DE HLA-A Y HLA-B EN RELACIÓN AL PRONÓSTICO DEL MELANOMA

Con objeto de evaluar la influencia del polimorfismo HLA-A y HLA-B en el pronóstico del melanoma, se realizó un estudio en el que se consideró, siguiendo los criterios de la AJCC, el grosor del tumor primario, la presencia o no de ulceración de la lesión primaria y la presencia o ausencia de metástasis en el ganglio centinela todo ello relacionado con HLA-A y HLA-B.

En la Tabla 21 se muestran las frecuencias de antígenos de histocompatibilidad HLA-A en los pacientes con melanoma con distintas características clínicas y en el grupo control. Los resultados revelaron la existencia de una disminución significativa en la frecuencia del antígeno HLA-A28 en el grupo de pacientes con un tumor >1 mm de grosor respecto a aquellos con un grosor ≤ 1 mm (5% vs. 15%, $P = 0.044$, $P_c > 0.05$, OR = 0.30). Además, también se observó una disminución en la frecuencia del antígeno HLA-A3 en los pacientes con ulceración en la lesión primaria respecto al grupo de pacientes sin ulceración (7% vs. 22%, $P = 0.047$, $P_c > 0.05$, OR = 0.24). Por el contrario, se detectó un aumento del antígeno HLA-A24 en pacientes con metástasis respecto al grupo de pacientes sin metástasis (46% vs. 26%); además, cuando los pacientes con metástasis fueron comparados con el grupo control la diferencia en la frecuencia de HLA-A24 alcanzó significación estadística (46% vs. 18%, $P = 0.021$, $P_c > 0.05$, OR = 4.01).

Tabla 21. Frecuencia de antígenos HLA-A en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Antígenos HLA-A	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 227 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
A1	45 (20)	12 (13)	16 (20)	19 (14)	9 (29)	17 (19)	1 (8)
A2	113 (50)	40 (43)	35 (44)	60 (44)	13 (42)	43 (47)	3 (23)
A3	44 (19)	19 (20)	15 (19)	30 (22)	2 (7)^b	21 (23)	2 (15)
A11	29 (13)	10 (11)	12 (15)	14 (10)	7 (23)	9 (10)	2 (15)
A23	13 (6)	5 (5)	4 (5)	7 (5)	1 (3)	5 (5)	0 (0)
A24	40 (18)	23 (25)	18 (23)	31 (23)	8 (26)	24 (26)	6 (46)^c
A25	6 (3)	4 (4)	1 (1)	5 (4)	0 (0)	3 (3)	0 (0)
A26	17 (8)	6 (6)	7 (9)	10 (7)	2 (7)	3 (3)	2 (15)
A28	20 (9)	14 (15)	4 (5)^a	17 (13)	1 (3)	8 (9)	2 (15)
A29	32 (14)	16 (17)	13 (16)	22 (16)	5 (16)	15 (16)	2 (15)
A30	27 (12)	16 (17)	14 (18)	24 (18)	5 (16)	17 (19)	2 (15)
A31	12 (5)	4 (4)	1 (1)	4 (3)	0 (0)	3 (3)	0 (0)
A32	16 (7)	7 (7)	3 (4)	7 (5)	2 (7)	4 (4)	1 (8)
A33	8 (4)	5 (5)	2 (3)	6 (4)	1 (3)	3 (3)	0 (0)
A34	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A66	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A blanco	31 (14)	7 (7)	14 (18)	15 (11)	6 (19)	9 (10)	3 (23)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela. El valor de *P* se determinó mediante el test exacto de Fisher.

^a, Grosor >1 mm vs. grosor, ≤1 mm, *P* = 0.044, *P*_c > 0.05, OR = 0.30, IC95 % = 0.09-0.95; ^b, Ulceración vs. no ulceración, *P* = 0.047, *P*_c > 0.05, OR = 0.24, IC95 % = 0.06-1.08; ^c, Metástasis vs. controles, *P* = 0.021, *P*_c > 0.05, OR = 4.01, IC95 % = 1.28-12.56.

En la Tabla 22 se recogen las frecuencias de los antígenos de histocompatibilidad HLA-B en el grupo de pacientes con melanoma según los mismos criterios clínicos y en el grupo control. En este caso se observó un aumento significativo en la frecuencia del antígeno HLA-B27 en el grupo de pacientes con melanoma cuyo tumor tenía >1 mm de grosor respecto a aquellos pacientes donde el tumor tenía ≤1 mm de grosor (9% vs. 1%, *P* = 0.025, *P*_c > 0.05, OR = 8.92). Por otra

parte, se observó una ausencia del antígeno HLA-B62 en pacientes con un tumor ≤ 1 mm de grosor respecto al grupo control ($P = 0.038$, $P_c > 0.05$), así como una disminución en la frecuencia de dicho antígeno en los pacientes que no presentaban ulceración respecto al grupo control (1% vs. 5%, $P = 0.036$, $P_c > 0.05$, OR = 0.15). Además, la frecuencia del antígeno HLA-B72 aparecía aumentada en los pacientes con un tumor >1 mm de grosor respecto a los controles (4% vs. 0%, $P = 0.017$, $P_c > 0.05$). Del mismo modo, se observó un incremento en la frecuencia del antígeno HLA-B53 en los pacientes con ulceración en la lesión primaria respecto a aquellos que no presentan ulceración al diagnóstico ($P = 0.034$, $P_c > 0.05$).

Por otra parte, se detectó un incremento en la frecuencia del antígeno HLA-B35 en pacientes con metástasis. Así, el antígeno HLA-B35 fue encontrado en un 39% de pacientes con metástasis, mientras que este antígeno sólo se presentó en un 13% de los pacientes sin metástasis ($P = 0.025$, $P_c > 0.05$, OR = 4.76). Así mismo, también se observó que la frecuencia de los antígenos HLA-B55 y HLA-B61 estaba aumentada en la población de pacientes con metástasis comparada con la del grupo control (15% vs. 2%, $P = 0.036$, $P_c > 0.05$, OR = 10.14 y 15% vs. 2%, $P = 0.049$, $P_c > 0.05$, OR = 8.07, respectivamente).

Tabla 22. Distribución de antígenos HLA-B en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Antígenos HLA-B	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 227 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
B7	39 (17)	16 (17)	1 (14)	22 (16)	5 (16)	19 (21)	0 (0)
B8	26 (11)	8 (9)	9 (11)	12 (9)	4 (13)	11 (12)	1 (8)
B13	10 (4)	3 (3)	2 (3)	4 (3)	0 (0)	3 (3)	0 (0)
B14	19 (8)	14 (15)	7 (9)	19 (14)	1 (3)	13 (14)	0 (0)
B18	34 (15)	21 (22)	16 (20)	31 (23)	5 (16)	18 (20)	3 (23)
B27	8 (4)	1 (1)	7 (9)^a	5 (4)	3 (10)	4 (4)	1 (8)
B35	43 (19)	17 (18)	14 (18)	24 (18)	7 (23)	12 (13)	5 (39)^f
B37	3 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
B38	15 (7)	5 (5)	8 (10)	10 (7)	2 (7)	9 (10)	1 (8)
B39	10 (4)	3 (3)	2 (3)	3 (2)	2 (7)	5 (5)	0 (0)
B41	9 (4)	5 (5)	1 (1)	6 (4)	0 (0)	4 (4)	0 (0)
B42	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B44	52 (23)	29 (31)	23 (29)	42 (31)	7 (23)	22 (24)	3 (23)
B45	4 (2)	4 (4)	3 (4)	5 (4)	2 (7)	4 (4)	1 (8)
B47	0 (0)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B49	20 (9)	6 (6)	7 (9)	8 (6)	4 (13)	8 (9)	0 (0)
B50	16 (7)	7 (7)	3 (4)	8 (6)	1 (3)	3 (3)	0 (0)
B51	47 (21)	18 (19)	14 (18)	24 (18)	5 (16)	14 (15)	3 (23)
B52	11 (5)	4 (4)	3 (4)	6 (4)	1 (3)	4 (4)	0 (0)
B53	6 (3)	0 (0)	2 (3)	0 (0)	2 (7)^d	0 (0)	0 (0)
B55	4 (2)	2 (2)	3 (4)	4 (3)	1 (3)	3 (3)	2 (15)^g
B56	4 (2)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B57	8 (4)	3 (3)	5 (6)	6 (4)	2 (7)	7 (8)	0 (0)
B58	6 (3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)
B60	15 (7)	6 (6)	5 (6)	7 (5)	3 (10)	7 (8)	0 (0)
B61	5 (2)	4 (4)	3 (4)	7 (5)	0 (0)	4 (4)	2 (15)^h
B62	11 (5)	0 (0)^b	1 (1)	1 (1)^e	0 (0)	1 (1)	0 (0)
B63	2 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (3)	1 (1)	1 (8)
B70	3 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (3)	1 (1)	0 (0)
B71	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B72	0 (0)	0 (0)	3 (4)^c	2 (2)	1 (3)	1 (1)	0 (0)
B75	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B blanco	21 (9)	8 (9)	3 (4)	10 (7)	1 (3)	4 (4)	3 (23)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela. El valor de *P* se determinó mediante el test exacto de Fisher.

^a, Grosor >1 mm vs. grosor ≤1 mm *P* = 0.025, *P*_c > 0.05, OR = 8.92, IC95 % = 1.07-74.12; ^b, Grosor ≤1 mm vs. controles, *P* = 0.038, *P*_c > 0.05; ^c, grosor >1mm vs. controles, *P* = 0.017, *P*_c > 0.05; ^d, Ulceración vs. no ulceración, *P* = 0.034, *P*_c > 0.05; ^e, No ulceración vs. controles, *P* = 0.036, *P*_c > 0.05, OR = 0.15, IC95 % = 0.02-1.14; ^f, Metástasis vs. no metástasis, *P* = 0.025, *P*_c > 0.05, OR = 4.76, IC95 % = 1.17-14.16; ^g, Metástasis vs. controles, *P* = 0.036, *P*_c > 0.05, OR = 10.14, IC95 % = 1.67-61.5; ^h, Metastasis vs. controles, *P* = 0.049, *P*_c > 0.05, OR = 8.07, IC95 % = 1.41-46.4.

El análisis de la relación de antígenos HLA-A y HLA-B con el pronóstico de la enfermedad fue ampliado considerando los epítomos serológicos HLA-Bw4 y HLA-Bw6. En la Tabla 23 se muestran las frecuencias de ambos epítomos HLA-Bw4 y HLA-Bw6 en pacientes con melanoma agrupados de acuerdo al grosor del tumor primario, la presencia o no de ulceración en la lesión primaria y la presencia o ausencia de metástasis en ganglio centinela. Como se puede observar, la distribución de los epítomos HLA-Bw4 y HLA-Bw6 no difería significativamente entre pacientes y controles, tampoco se observaron diferencias significativas cuando se compararon los diferentes grupos entre sí, o cuando los pacientes fueron comparados con el grupo control.

Tabla 23. Frecuencia de epítomos HLA-Bw4 y HLA-Bw6 en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Epítomo HLA-Bw	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 227 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
Bw4	179 (79)	72 (77)	65 (81)	106 (78)	25 (81)	71 (77)	10 (77)
Bw6	182 (80)	80 (85)	66 (83)	116 (85)	26 (84)	80 (87)	11 (85)
Genotipo Bw							
Bw4/Bw4	45 (20)	14 (15)	14 (17)	20 (15)	5 (16)	12 (13)	2 (15)
Bw6/Bw6	48 (21)	22 (23)	15 (19)	30 (22)	6 (19)	21 (23)	3 (23)
Bw4/Bw6	134 (59)	58 (62)	51 (64)	86 (63)	20 (65)	59 (64)	8 (62)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Posteriormente, se examinó la distribución de los alotipos y genotipos HLA-Bw4 (Thr80) y HLA-Bw4 (Ile80) en función de las características clínicas de los pacientes al diagnóstico, pero tampoco se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos de pacientes entre sí, o cuando éstos fueron comparados con el grupo control (Tabla 24).

Tabla 24. Frecuencia de alotipos HLA-Bw4 según el dimorfismo en posición 80 (Thre/Ile) en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Alotipos HLA-Bw4	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 179 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 72 n (%)	> 1 N = 65 n (%)	No N = 106 n (%)	Sí N = 25 n (%)	No N = 71 n (%)	Sí N = 10 n (%)
Bw4 ^{Thr80}	70 (31)	35 (49)	32 (49)	53 (50)	10 (40)	30 (42)	4 (40)
Bw4 ^{Ile80}	147 (65)	60 (83)	50 (77)	81 (76)	23 (92)	58 (82)	8 (80)
Genotipo Bw4							
Bw4 ^{Thr80/Thr80}	32 (18)	12 (17)	15 (23)	25 (24)	2 (8)	13 (18)	2 (20)
Bw4 ^{Ile80/Ile80}	109 (61)	37 (51)	33 (51)	53 (50)	15 (60)	41 (58)	6 (60)
Bw4 ^{Thr80/Ile80}	38 (21)	23 (32)	17 (26)	28 (26)	8 (32)	17 (24)	2 (20)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

4. PAPEL DE LOS ALELOS HLA-C EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL MELANOMA

Para este estudio el número de controles se incrementó hasta 356 con objeto de confirmar los resultados del primer análisis.

Respecto al análisis influencia del locus HLA-C en la susceptibilidad de la enfermedad (Tabla 25), se pudo observar una disminución en la frecuencia del alelo HLA-C*07 cuando el total de pacientes se comparó con el grupo control (33% vs. 45%, $P = 0.007$, $P_c > 0.05$, OR = 0.59). Esta disminución del alelo HLA-C*07 se observó también en el grupo de pacientes con MES comparado con el grupo control (32% vs. 45%, $P = 0.014$, $P_c > 0.05$, OR = 0.58). Por el contrario, la frecuencia del alelo HLA-C*17 estaba aumentada en el grupo total de pacientes respecto al grupo control (8% vs. 3%, $P = 0.012$, $P_c > 0.05$, OR = 3.03). Este aumento se observó tanto en el grupo de pacientes con MES como con MN, pero sólo se alcanzaron diferencias significativas cuando el grupo de pacientes con MES fue comparado con el grupo control (9% vs. 3%, $P = 0.008$, $P_c > 0.05$, OR = 3.46), probablemente

debido al menor número de pacientes MN de este estudio. Sin embargo, tras aplicar la corrección de Bonferroni, las significaciones se perdieron aunque ya hemos reseñado anteriormente que esta corrección es excesivamente conservadora.

Tabla 25. Frecuencia de los alelos HLA-C en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Alelos HLA-C	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 356 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
*01	18 (5)	8 (5)	5 (4)	0 (0)
*02	38 (11)	22 (13)	16 (13)	1 (5)
*03	42 (12)	14 (8)	10 (8)	4 (20)
*04	96 (27)	38 (22)	23 (19)	8 (40)
*05	68 (19)	42 (24)	32 (26)	3 (15)
*06	48 (14)	17 (10)	11 (9)	0 (0)
*07	161 (45)	57 (33)^a	39 (32)^b	9 (45)
*08	28 (8)	22 (13)	15 (12)	1 (5)
*12	63 (18)	27 (16)	19 (16)	7 (35)
*14	11 (3)	5 (3)	0 (0)	0 (0)
*15	26 (7)	17 (10)	12 (10)	1 (5)
*16	52 (15)	26 (15)	19 (16)	1 (5)
*17	10 (3)	14 (8)^c	11 (9)^d	2 (10)
*18	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. El valor de *P* se determinó mediante el test exacto de Fisher. ^a, Total de pacientes vs. controles, *P* = 0.007, *P_c* > 0.05, OR = 0.59, IC95%: 0.40-0.86; ^b, MES vs. controles, *P* = 0.014, *P_c* > 0.05, OR = 0.58, IC95%: 0.37-0.89; ^c, Total de pacientes vs. controles, *P* = 0.012, *P_c* > 0.05, OR = 3.03, IC95%: 1.32-6.96; ^d, MES vs. controles, *P* = 0.008, *P_c* > 0.05, OR = 3.46, IC95%: 1.43-8.37.

Posteriormente, se valoró la influencia que podría derivarse del dimorfismo en posición 80 de la hélice- α 1 de los alelos HLA-C en la susceptibilidad al melanoma (Tabla 26). Esto es, en función del aminoácido localizado en la posición 80 de la cadena α 1 del HLA-C se clasificaron como grupo C1 a aquellos alelos que portaban asparagina (Asn) en esa posición, incluyendo los alelos HLA-C*01, HLA-C*03, HLA-C*07, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14 y HLA-C*1601 y

como grupo C2, que incluye los alelos HLA-C que con lisina (Lys) en esa posición, que comprende los alelos HLA-C*02, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*15, HLA-C*1602, HLA-C*17 y HLA-C*18.

En un primer análisis se observó que la frecuencia de los alelos de HLA-C del grupo C1 (HLA-C^{Asn80}) estaba significativamente disminuida en los pacientes con melanoma, donde los alelos integrantes del grupo C1 representaron un 72% mientras que en el grupo control su representación alcanzó el 81% ($P = 0.024$, OR = 0.61).

Tabla 26 Frecuencia de ligandos HLA-C según el dimorfismo en posición 80 (Asn/Lys) en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Alotipos HLA-C	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 356 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
HLA-C ^{Asn80}	289 (81)	126 (72) ^a	86 (71) ^b	16 (80)
HLA-C ^{Lys80}	249 (70)	127 (73)	89 (74)	11 (55)
Genotipo HLA-C				
HLA-C ^{Asn80/Asn80}	107 (30)	47 (27)	32 (26)	9 (45)
HLA-C ^{Lys80/Lys80}	67 (19)	48 (28) ^c	35 (29) ^d	4 (20)
HLA-C ^{Asn80/Lys80}	182 (51)	79 (45)	54 (45)	7 (35)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. El valor de P se determinó mediante el test exacto de Fisher. ^a, Pacientes totales vs. controles, $P = 0.024$, OR = 0.61, IC95%: 0.40-0.93; ^b, MES vs. controles, $P = 0.021$, OR = 0.57, IC95%: 0.35-0.92; ^c, Pacientes totales vs. controles, $P = 0.024$, OR = 1.64, IC95%: 1.07-2.52; ^d, MES vs. controles, $P = 0.021$, OR = 1.76, IC95%: 1.09-2.82.

Con posterioridad, los pacientes y los controles se clasificaron en tres grupos atendiendo a su genotipo HLA-C de acuerdo al dimorfismo en posición 80 según se describe en material y métodos y representamos en la Tabla 26. Curiosamente, los resultados revelaron un aumento significativo de los individuos homocigotos para los alelos del grupo C2 (HLA-C^{Lys80/Lys80}) en el total de pacientes respecto al grupo

control (28% vs. 19%, $P = 0.024$, $OR = 1.64$), mientras que no se detectaron diferencias relevantes en los individuos homocigotos para HLA-C^{Asn80} o en los heterocigotos (HLA-C^{Asn80/Lys80}).

La distribución de los alelos de HLA-C pertenecientes a los grupos C1 (HLA-C^{Asn80}) y C2 (HLA-C^{Lys80}) también fue examinada considerando los dos subtipos histológicos de melanoma más frecuentes (MES y MN). Los resultados mostraron una disminución significativa en la frecuencia de HLA-C^{Asn80} en pacientes del subtipo MES respecto al grupo control (71% vs. 81%; $P = 0.021$, $OR = 0.57$). Por el contrario, se detectó un aumento en la frecuencia de individuos homocigotos HLA-C^{Lys80/Lys80} dentro del grupo de pacientes MES comparado con el grupo control (29% vs. 19%; $P = 0.021$, $OR = 1.76$). Sin embargo, la comparación entre el grupo de pacientes MN y el grupo control no reflejó diferencias significativas en alotipos o genotipos (Tabla 26).

5. HLA-C Y SU PAPEL PRONÓSTICO EN EL MELANOMA

En la Tabla 27 se muestran las frecuencias de los alelos HLA-C en el grupo de controles sanos y en el de pacientes con melanoma clasificados de acuerdo al grosor del tumor primario, la ulceración de la lesión primaria y la metástasis en ganglio centinela, siguiendo los criterios de la AJCC. Como puede observarse, la frecuencia del alelo HLA-C*07 en el grupo de pacientes con un tumor ≤ 1 mm de grosor y en el de pacientes con melanoma sin ulceración en la lesión primaria aparecía significativamente disminuida respecto al grupo control (26% vs. 45%, $P = 0.001$, $P_c = 0.014$ y $OR = 0.42$ y 29% vs. 45%, $P = 0.001$, $P_c = 0.014$, $OR = 0.50$, respectivamente), esta diferencia tras aplicar la corrección de Bonferroni mantenía significación estadística. Contrariamente, se observó un aumento en la frecuencia del alelo HLA-C*07 en los pacientes cuyo tumor tenía >1 mm de grosor respecto a los que tenían un tumor con ≤ 1 mm de grosor (41% vs. 26%, $P = 0.035$, $P_c > 0.05$, $OR = 2.05$), así como una disminución en la frecuencia de dicho alelo en pacientes con metástasis respecto al grupo control (15% vs. 45%, $P = 0.045$, $P_c > 0.05$, $OR = 0.22$). Sin embargo, estas diferencias no mantuvieron la significación estadística tras aplicar la corrección de Bonferroni.

También se observó un aumento en la frecuencia del alelo HLA-C*08 en el grupo de pacientes con un tumor ≤ 1 mm de grosor, en los pacientes sin ulceración y en los pacientes sin metástasis en ganglio centinela respecto al grupo control (16% vs. 8%, $P = 0.028$, $P_c > 0.05$, OR = 2.22; 15% vs. 8%, $P = 0.027$, $P_c > 0.05$, OR = 2.02; 15% vs. 8%, $P = 0.043$, $P_c > 0.05$, OR = 2.10, respectivamente). Además, se observó un incremento en la frecuencia del alelo HLA-C*17 en el grupo de pacientes con un tumor ≤ 1 mm de grosor y en los pacientes sin ulceración respecto al grupo control (10% vs. 3%, $P = 0.008$, $P_c > 0.05$, OR = 3.67 y 9% vs. 3%, $P = 0.007$, $P_c > 0.05$, OR = 3.35, respectivamente).

Por último, el análisis del locus HLA-C también reveló un aumento en la frecuencia del alelo HLA-C*04 en el grupo de pacientes con metástasis respecto al grupo libre de metástasis. Así, el alelo HLA-C*04 fue detectado en un 46% de pacientes con metástasis, mientras que la incidencia en pacientes sin metástasis alcanzó el 15% ($P = 0.017$, $P_c > 0.05$, OR = 4.78). No obstante, la significación observada no soportó la corrección de Bonferroni.

En un análisis posterior se evaluó la influencia de los grupos C1 y C2 de los alelos de HLA-C respecto a las características clínicas al diagnóstico (Tabla 28). Este estudio reveló una disminución significativa de la frecuencia de los alelos de HLA-C del grupo C1 (HLA-C^{Asn80}) en los pacientes con un tumor ≤ 1 mm de grosor y en aquellos sin ulceración al diagnóstico respecto al grupo control (69% vs. 81%, $P = 0.016$, OR = 0.52 y 70% vs. 81%, $P = 0.01$, OR = 0.54, respectivamente). Igualmente, se observó una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia del alotipo HLA-C^{Asn80} en los pacientes con metástasis en ganglio centinela. En efecto, los alelos HLA-C del grupo C1 estaban presentes en un 46% de los pacientes con metástasis mientras que su frecuencia representó un 80% en los pacientes sin metástasis y un 81% en controles ($P = 0.013$, OR = 0.21 y $P = 0.006$, OR = 0.20, respectivamente). Por otra parte, la frecuencia del alotipo HLA-C^{Lys80} estaba disminuida en los pacientes con ulceración en el tumor respecto a los que no presentaban ulceración ($P = 0.045$, OR = 0.43), pero en este caso las diferencias no fueron significativas tras la corrección de Bonferroni.

Tabla 27. Frecuencia de los alelos HLA-C en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Alelos HLA-C	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 356 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
*01	18 (5)	4 (4)	4 (5)	6 (4)	2 (7)	5 (5)	1 (8)
*02	38 (11)	12 (13)	10 (13)	19 (14)	2 (7)	8 (9)	3 (23)
*03	42 (12)	6 (6)	8 (10)	11 (8)	2 (7)	9 (10)	1 (8)
*04	96 (27)	18 (19)	20 (25)	29 (21)	8 (26)	14 (15)^h	6 (46)^j
*05	68 (19)	26 (28)	16 (20)	36 (27)	5 (16)	20 (22)	2 (15)
*06	48 (14)	10 (11)	7 (9)	15 (11)	2 (7)	11 (12)	1 (8)
*07	161 (45)	24 (26)^a	33 (41)^d	40 (29)^e	15 (49)	34 (37)	2 (15)^k
*08	28 (8)	15 (16)^b	7 (9)	20 (15)^f	1 (3)	14 (15)ⁱ	0 (0)
*12	63 (18)	15 (16)	16 (20)	22 (16)	8 (26)	22 (24)	1 (8)
*14	11 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
*15	26 (7)	10 (11)	7 (9)	12 (9)	3 (10)	6 (7)	2 (15)
*16	52 (15)	16 (17)	10 (13)	21 (15)	3 (10)	15 (16)	2 (15)
*17	10 (3)	9 (10)^c	5 (6)	12 (9)^g	2 (7)	6 (7)	0 (0)
*18	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela. El valor de *P* se determinó mediante el test exacto de Fisher.

^a, Grosor ≤1mm vs. controles, *P* = 0.001, *P*_c = 0.014, OR = 0.42, IC95%: 0.25-0.69; ^b, Grosor ≤1mm vs. controles, *P* = 0.028, *P*_c > 0.05, OR = 2.22, IC95%: 1.13-4.36 y ^c, Grosor ≤1mm vs. controles, *P* = 0.008, *P*_c > 0.05, OR = 3.67, IC95%: 1.44-9.30; ^d, Grosor >1mm vs. grosor ≤1mm, *P* = 0.035, *P*_c > 0.05, OR = 2.05, IC95%: 1.08-3.89; ^e, No ulceración vs. controles, *P* = 0.001, *P*_c = 0.014, OR = 0.50, IC95%: 0.33-0.77; ^f, No ulceración vs. controles, *P* = 0.027, *P*_c > 0.05, OR = 2.02, IC95%: 1.10-3.72 y ^g, No ulceración vs. controles, *P* = 0.007, *P*_c > 0.05, OR = 3.35, IC95%: 1.41-7.94; ^h, No metástasis vs. controles, *P* = 0.021, *P*_c > 0.05, OR = 0.49, IC95%: 0.26-0.90 e ⁱ, No metástasis vs. controles, *P* = 0.043, *P*_c > 0.05, OR = 2.10, IC95%: 1.06-4.18; ^j, Metástasis vs. no metástasis, *P* = 0.017, *P*_c > 0.05, OR = 4.78, IC95%: 1.40-16.34 y ^k, Metástasis vs. controles, *P* = 0.045, *P*_c > 0.05, OR = 0.22, IC95%: 0.05-1.01.

En un análisis subsiguiente se examinó la distribución de los genotipos HLA-C atendiendo al dimorfismo en la posición 80 de la de la hélice-α1(Asp80 y/o Lys80) considerando combinaciones en homocigosis o heterocigosis y las características clínicas de los pacientes al diagnóstico (Tabla 28). Dicho análisis reveló que, respecto a la frecuencia observada en el grupo control, existía un aumento significativo en la frecuencia del genotipo HLA-C2/C2 (HLA-C^{Lys80/Lys80})

en pacientes cuyo tumor tenía un grosor ≤ 1 mm en los que presentaban el tumor sin ulceración (31% vs. 19%, $P = 0.016$, OR = 1.92 y 30% vs. 19%, $P = 0.01$, OR = 1.86, respectivamente). Además, este estudio reveló que la frecuencia de individuos homocigotos para HLA-C^{Lys80} estaba aumentada en pacientes con metástasis respecto a aquellos pacientes sin metástasis y respecto a los controles (54% vs. 20%, $P = 0.013$, OR = 4.80 y 54% vs. 19% y $P = 0.006$, OR = 5.03, respectivamente). Por último, se detectó un aumento en la frecuencia de individuos homocigotos con genotipo HLA-C1/C1 (HLA-C^{Asn80/Asn80}) en el grupo de pacientes con ulceración respecto a aquellos que no presentaban ulceración ($P = 0.045$, OR = 2.35).

Tabla 28. Distribución de alotipos y genotipos HLA-C en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Alotipos HLA-C	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 356 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤ 1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
C ^{Asn80}	289 (81)	65 (69)^a	61 (76)	95 (70)^c	25 (81)	74 (80)	6 (46)^{g,i}
C ^{Lys80}	249 (70)	72 (77)	55 (69)	104 (77)	18 (58)^e	57 (62)	11 (85)
Genotipo HLA-C							
C ^{Asn80/Asn80}	107 (30)	22 (23)	25 (31)	32 (24)	13 (42)^f	35 (38)	2 (15)
C ^{Lys80/Lys80}	67 (19)	29 (31)^b	19 (24)	41 (30)^d	6 (19)	18 (20)	7 (54)^{h,j}
C ^{Asn80/Lys80}	182 (51)	43 (46)	36 (45)	63 (46)	12 (39)	39 (42)	4 (31)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela. El valor de P se determinó mediante el test exacto de Fisher.^a, Grosor ≤ 1 mm vs. controles, $P = 0.016$, OR = 0.52, IC95%: 0.31-0.87; ^b, Grosor ≤ 1 mm vs. controles, $P = 0.016$, OR = 1.92, IC95%: 1.15-3.21; ^c, No ulceración vs. controles, $P = 0.01$, OR = 0.54, IC95%: 0.34-0.85; ^d, No ulceración vs. controles, $P = 0.01$, OR = 1.86, IC95%: 1.18-2.93; ^e, Ulceración vs. no ulceración, $P = 0.045$, OR = 0.43, IC95%: 0.19-0.96; ^f, Ulceración vs. no ulceración, $P = 0.045$, OR = 2.35, IC95%: 1.04-5.31; ^g, Metástasis vs. no metástasis, $P = 0.013$, OR = 0.21, IC95%: 0.06-0.69; ^h, Metástasis vs. no metástasis, $P = 0.013$, OR = 4.80, IC95%: 1.44-16.02; ⁱ, Metástasis vs. controles, $P = 0.006$, OR = 0.20, IC95%: 0.07-0.61; ^j, Metástasis vs. controles, $P = 0.006$, OR = 5.03, IC95%: 1.64-15.46.

6. ANTÍGENOS HLA DE CLASE II (HLA-DR Y -DQ) EN RELACION CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL MELANOMA

En la comparación de frecuencias de los alelos HLA de clase II en pacientes con melanoma respecto al grupo de individuos sanos no se observaron diferencias significativas para HLA-DRB1 (Tabla 29) ni para HLA-DQB1 (Tabla 30). También se compararon las frecuencias de los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en controles y pacientes con melanoma considerando los dos subtipos histológicos más frecuentes, MES y MN, pero las diferencias no fueron significativas cuando se compararon ambos subgrupos de melanoma con el grupo control ni tampoco cuando se compararon ambos entre sí.

Tabla 29. Frecuencia de alelos HLA-DRB1 en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Alelos HLA-DRB1	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 227 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
*01	49 (22)	43 (25)	28 (23)	5 (25)
*03	56 (25)	44 (25)	31 (26)	5 (25)
*04	55 (24)	43 (25)	32 (26)	5 (25)
*07	63 (28)	55 (32)	37 (31)	5 (25)
*08	13 (6)	9 (5)	8 (7)	0 (0)
*09	3 (1)	4 (2)	3 (3)	0 (0)
*10	6 (3)	5 (3)	4 (3)	0 (0)
*11	60 (26)	44 (25)	30 (25)	6 (30)
*12	10 (4)	2 (1)	1 (1)	0 (0)
*13	46 (20)	35 (20)	25 (21)	4 (20)
*14	7 (3)	8 (5)	6 (5)	1 (5)
*15	55 (24)	31 (18)	20 (17)	5 (25)
*16	6 (3)	9 (5)	5 (4)	1 (5)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular

Tabla 30. Frecuencia de alelos HLA-DQB1 en controles sanos y en pacientes con melanoma y los subtipos histológicos más frecuentes

Alelos HLA-DQB1	Grupo control	Pacientes con melanoma		
	N = 227 n (%)	Total N = 174 n (%)	Subtipo histológico	
			MES N = 121 n (%)	MN N = 20 n (%)
*02	106 (47)	90 (52)	62 (51)	9 (45)
*03:01	86 (38)	60 (35)	46 (38)	5 (25)
*03:02	43 (19)	24 (14)	14 (12)	5 (25)
*03:03	6 (3)	7 (4)	5 (4)	1 (5)
*04	12 (5)	7 (4)	7 (6)	0 (0)
*05	65 (29)	61 (35)	40 (33)	6 (30)
*06	93 (41)	59 (34)	40 (33)	8 (40)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular

7. ESTUDIO DE LA RELACION DE HLA-DR Y HLA-DQ CON EL PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

En la Tabla 31 se muestran las frecuencias de los alelos HLA-II (HLA-DRB1) en los pacientes con melanoma agrupados según las características clínicas que presentaban al diagnóstico y en el grupo control. Los resultados revelaron la existencia de un aumento significativo en la frecuencia del antígeno HLA-DRB1*01 en el grupo total de pacientes con melanoma con ulceración respecto al grupo control (39% vs. 22%, $P = 0.043$, $P_c > 0.05$, OR = 2.29). Por el contrario, la frecuencia del alelo HLA-DRB1*07 estaba disminuida en el grupo de pacientes con ulceración comparado con el grupo control (10% vs. 28%, $P = 0.029$, $P_c > 0.05$, OR = 0.28). Esta diferencia aumentó cuando el grupo de pacientes con ulceración fue comparado con el grupo sin ulceración (10% vs. 36%, $P = 0.005$, $P_c > 0.05$, OR = 0.19). Por otra parte, también pudo observar una disminución en la frecuencia del alelo HLA-DRB1*13 en pacientes con ulceración respecto al grupo de pacientes sin ulceración (7% vs. 22%, $P = 0.045$, $P_c > 0.05$, OR = 0.22).

Tabla 31. Frecuencia de los alelos HLA-DRB1 en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Alelos HLA-DRB1	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 227 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
*01	49 (22)	23 (25)	20 (25)	30 (22)	12 (39)^a	24 (26)	1 (8)
*03	56 (25)	24 (26)	20 (25)	32 (24)	11 (36)	25 (27)	4 (31)
*04	55 (24)	26 (28)	17 (21)	30 (22)	9 (29)	22 (24)	4 (31)
*07	63 (28)	34 (36)	21 (26)	49 (36)	3 (10)^{b, c}	29 (32)	3 (23)
*08	13 (6)	6 (6)	3 (4)	9 (7)	0 (0)	5 (5)	0 (0)
*09	3 (1)	1 (1)	3 (4)	4 (3)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
*10	6 (3)	3 (3)	2 (3)	5 (4)	0 (0)	4 (4)	0 (0)
*11	60 (26)	20 (21)	24 (30)	32 (24)	11 (36)	20 (22)	4 (31)
*12	10 (4)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (3)	1 (1)	0 (0)
*13	46 (20)	19 (20)	16 (20)	32 (24)	2 (7)^d	19 (21)	2 (15)
*14	7 (3)	5 (5)	3 (4)	7 (5)	1 (3)	2 (2)	1 (8)
*15	55 (24)	17 (18)	14 (18)	27 (20)	3 (10)	19 (21)	1 (8)
*16	6 (3)	5 (5)	4 (5)	7 (5)	1 (3)	4 (4)	1 (8)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela. El valor de P se determinó mediante el test exacto de Fisher. ^a, Ulceración vs. controles, P = 0.043, P_c > 0.05, OR = 2.29, IC95 % = 1.04-5.05; ^b, Ulceración vs. controles, P = 0.029, P_c > 0.05, OR = 0.28, IC95 % = 0.08-0.95; ^c, Ulceración vs. no ulceración, P = 0.005, P_c > 0.05, OR = 0.19, IC95 % = 0.06-0.66; ^d, Ulceración vs. no ulceración, P = 0.045, P_c > 0.05, OR = 0.22, IC95 % = 0.05-0.99.

Respecto al estudio de la influencia del locus HLA-DQB1 en el pronóstico del melanoma (Tabla 32), se pudo constatar la existencia de un aumento significativo del alelo HLA-DQB1*03:03 en el grupo de pacientes con melanoma cuyo tumor tenía >1 mm de grosor respecto al grupo de pacientes con melanoma de ≤1 mm de grosor (8% vs. 1%, P = 0.049, P_c > 0.05, OR = 7.54). Además, también se encontró un aumento en la frecuencia del alelo HLA-DQB1*03:02 en pacientes con ulceración respecto al grupo de pacientes sin ulceración (26% vs. 11%, P = 0.043, P_c > 0.05, OR = 2.81). Por el contrario, los resultados mostrados en la Tabla 32 también indican que el alelo HLA-DQB1*06 estaba menos representado en la población de pacientes con ulceración en la lesión primaria que en aquellos con tumor sin

ulceración (16% vs. 39%, $P = 0.02$, $P_c > 0.05$, OR = 0.30). Esta diferencia también fue patente cuando el grupo de pacientes con ulceración se comparó con el grupo control (16% vs. 41%, $P = 0.009$, $P_c > 0.05$, OR = 0.28). Sin embargo, las diferencias anteriormente mencionadas para los locus HLA-DQB1 y HLA-DQB1 en relación a las características clínicas de los pacientes con melanoma al diagnóstico se perdieron tras aplicar la corrección de Bonferroni.

Tabla 32. Frecuencia de los alelos HLA-DQB1 en controles sanos y pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico

Alelos HLA-DQB1	Grupo Control	Características clínicas del melanoma					
	N = 227 n (%)	Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤1 N = 94 n (%)	> 1 N = 80 n (%)	No N = 136 n (%)	Sí N = 31 n (%)	No N = 92 n (%)	Sí N = 13 n (%)
*02	106 (47)	55 (59)	35 (44)	73 (54)	13 (42)	49 (53)	6 (46)
*03:01	86 (38)	31 (33)	29 (36)	45 (33)	11 (36)	30 (33)	7 (54)
*03:02	43 (19)	11 (12)	13 (16)	15 (11)	8 (26)^b	11 (12)	2 (15)
*03:03	6 (3)	1 (1)	6 (8)^a	6 (4)	1 (3)	3 (3)	1 (8)
*04	12 (5)	4 (4)	3 (4)	6 (4)	1 (3)	3 (3)	0 (0)
*05	65 (29)	35 (37)	26 (33)	46 (34)	13 (42)	34 (37)	2 (15)
*06	93 (41)	33 (35)	26 (33)	53 (39)	5 (16)^{c, d}	33 (36)	3 (23)

Abreviaturas: GC, ganglio centinela. El valor de P se determinó mediante el test exacto de Fisher.

^a, Grosor >1mm vs. grosor ≤ 1mm, $P = 0.049$, $P_c > 0.05$, OR = 7.54, IC95 % = 0.89-64.02; ^b, Ulceración vs. no ulceración. $P = 0.043$, $P_c > 0.05$, OR = 2.81, IC95 % = 1.07-7.38; ^c, Ulceración vs. controles, $P = 0.009$, $P_c > 0.05$, OR = 0.28, IC95 % = 0.10-0.75.; ^d, Ulceración vs. no ulceración, $P = 0.02$, $P_c > 0.05$, OR = 0.30, IC95 % = 0.11-0.83

8. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE HLA-E EN PACIENTES CON MELANOMA

En la Tabla 33 se muestran las frecuencias de los alelos HLA-E en pacientes con melanoma y en el grupo control y, como se puede observar, no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos grupos.

Los alelos más comunes tanto en controles como en pacientes con melanoma fueron el HLA-E*0101 con unas frecuencias de 69% y 74%, respectivamente; seguidos por el alelo HLA-E*01032 con una frecuencia de 61% y 53%, respectivamente y el HLA-E*01031 con una frecuencia de 26% y 24%, respectivamente. Un dato interesante de este trabajo, es que entre los individuos estudiados ninguno era portador del alelo HLA-E*0102, dato que difería de lo publicado en otra población española en la que el alelo HLA-E*0102 aparecía con una frecuencia del 10% (Gómez-Casado et al., 1997). Precisamente, la existencia de este alelo así como la de HLA-E*0104, que tampoco aparecía en nuestra serie, fue cuestionada (Grimsley et al., 2002) y finalmente el alelo HLA-E*0102 fue retirado de la base de datos IMGT/HLA.

Tabla 33. Frecuencia de los alelos y genotipos HLA-E controles sanos y en pacientes con melanoma

Alelos HLA-E	Grupo control N = 100 n (%)	Pacientes con melanoma N = 100 n (%)
*0101	69 (69)	74 (74)
*0102	-	-
*01031	26 (26)	24 (24)
*01032	61 (61)	53 (53)
*0104	-	-
Genotipo HLA-E		
*0101, 0101	26 (26)	30 (30)
*0101, 01031	10 (10)	14 (14)
*0101, 01032	33 (33)	30 (30)
*01031, 01032	13 (13)	7 (7)
*01031, 01031	3 (3)	3 (3)
*01032, 01032	15 (15)	16 (16)

El análisis de genotipos de HLA-E también fue considerado y se identificaron seis genotipos diferentes (Tabla 33) sin que se pudieran demostrar diferencias en las frecuencias de los genotipos HLA-E entre pacientes y controles.

Posteriormente, se realizó un análisis basado en la sustitución no sinónima en posición 107 del dominio alfa-2 del exón 3: Arg (R) *versus* Gly (G). Para ello, los pacientes y controles fueron divididos en tres grupos, a saber: el grupo 1 estaba compuesto por individuos que portan únicamente alelos HLA-E con el epítipo R (homocigotos R/R), el grupo 2 incluía individuos portadores únicamente de alelos HLA-E con el epítipo G (homocigotos G/G), y, por último, el grupo 3 que agrupaba individuos portadores alelos HLA-E con ambos epítipos R y G (heterocigotos R/G). La distribución de los fenotipos HLA-E (R) y HLA-E (G) no difería significativamente entre pacientes y controles (Tabla 34).

Tabla 34. Distribución de los fenotipos HLA-E (R) y HLA-E (G) en controles sanos y en pacientes con melanoma

Fenotipo HLA-E*	Grupo control N = 100 n (%)	Pacientes con melanoma N = 100 n (%)
HLA-E (R)/HLA-E (R)	26 (26)	30 (30)
HLA-E (G)/HLA-E (G)	31 (31)	26 (26)
HLA-E (R)/HLA-E (G)	43 (43)	44 (44)

Abreviaturas: R, arginina (Arg); G, glicina (Gly)

Las frecuencias de alelos HLA-E estudiados también fueron examinadas considerando los dos subtipos histológicos de melanoma más frecuentes (MES y MN), así como los otros parámetros clínicos relevantes en el momento del diagnóstico, tales como grosor del tumor primario, la ulceración de la lesión primaria o la presencia de metástasis en ganglio centinela; sin embargo, en ningún caso se observaron diferencias significativas cuando se compararon los diferentes grupos de pacientes, o cuando los pacientes fueron comparados con el grupo control (datos no mostrados).

9. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CD57, CD56, CD94 Y CD161, EN CÉLULAS T CD8⁺ DE PACIENTES CON MELANOMA

Con posterioridad a los estudios inmunogenéticos también se abordó el estudio de la expresión de moléculas NKR, cuyos ligandos no son las moléculas HLA, sobre células T CD8⁺ de sangre periférica en una serie de 41 pacientes con melanoma y 39 individuos sanos comparables en sexo y edad. También se evaluó en ellos la expresión de la molécula de activación HLA-DR y la molécula coestimuladora CD28 sobre las células T CD8⁺.

En la Tabla 35 se recogen los datos demográficos y las características histológicas y clínicas de los 41 pacientes estudiados. Esta serie de pacientes estaba constituida por individuos que presentaban diferentes subtipos de melanoma cutáneo, a saber, 35 MES, 4 MLM y 2 MLA; en ninguno de ellos se evidenciaron metástasis distales (regionales o viscerales) y el estadiaje fue realizado de acuerdo con la clasificación de la AJCC, es decir, considerando el grosor del tumor primario, la ulceración de la lesión primaria, así como la positividad o negatividad de la biopsia del ganglio centinela. De este modo, 30 pacientes fueron clasificados como estadio I, que agrupaba a los pacientes con $\leq 1-2,0$ mm de grosor y sin ulceración ni metástasis; 5 pacientes se clasificaron como estadio II, que agrupaba a los pacientes con 2,0 - 4,0 mm con o sin ulceración y sin metástasis y, finalmente, 6 pacientes fueron clasificados como estadio III, que incluía a cualquier paciente al que se le hubiese detectado la metástasis en el ganglio centinela. El análisis comparativo se realizó entre la suma de los pacientes que no presentaban metástasis en ganglio centinela (estadio I-II) y los que sí presentaban metástasis en ganglio centinela (estadio III).

Para el análisis de linfocitos en sangre periférica de pacientes y controles se diseñaron métodos citométricos dirigidos al reconocimiento en membrana de la expresión de NKR, originalmente descritos en células NK, pero también observados en una subpoblación de linfocitos T efectores citotóxicos, la mayoría de los cuales se expresan en la subpoblación de células T de fenotipo CD8⁺CD28⁻. Para ello, como se ha descrito en material y métodos, se optimizó un protocolo de marcaje utilizando

anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas CD57, CD56, CD94 o CD161 (Figura 33).

Tabla 35. Datos demográficos y características histológicas y clínicas de los pacientes al momento del diagnóstico del melanoma

Pacientes [n = 41]	Edad/Sexo	Subtipo histológico	Grosor del tumor primario(mm)	Metástasis en ganglio centinela	Ulceración de la lesión primaria	Estadio clínico al diagnóstico*
1	42/M	MES	≤1	-	-	I
2	24/M	MES	≤1	-	-	I
3	46/M	MES	2.01-4.0	-	ND	II
4	47/V	MLM	≤1	-	-	I
5	61/V	MLM	≤1	-	-	I
6	56/M	MES	≤1	-	-	I
7	25/M	MES	≤1	-	-	I
8	48/M	MLM	≤1	-	-	I
9	44/M	MES	≤1	-	-	I
10	40/V	MES	≤1	-	-	I
11	45/V	MES	≤1	-	-	I
12	57/M	MES	1.01-2.0	-	-	I
13	54/M	MES	≤1	-	-	I
14	60/M	MES	≤1	-	-	I
15	52/M	MES	≤1	+	-	III
16	64/M	MES	≤1	-	-	I
17	43/V	MES	≤1	-	-	I
18	50/M	MLA	≤1	-	-	I
19	62/V	MES	≤1	-	-	I
20	26/M	MES	>4	+	+	III
21	50/M	MES	≤1	-	-	I
22	47/M	MES	2.01-4.0	-	-	II
23	34/M	MES	≤1	-	-	I
24	52/V	MES	1.01-2.0	-	-	I
25	60/V	MES	≤1	-	-	I
26	35/V	MES	≤1	-	-	I
27	56/V	MES	≤1	-	-	I
28	33/V	MES	1.01-2.0	+	+	III
29	60/V	MES	1.01-2.0	-	-	I
30	54/V	MES	≤1	-	-	I
31	55/V	MES	2.01-4.0	-	+	II
32	65/V	MLM	>4	-	-	II
33	45/V	MES	≤1	-	-	I
34	55/M	MES	≤1	-	-	I
35	31/M	MES	1.01-2.0	-	-	I
36	47/V	MES	1.01-2.0	+	-	III
37	34/V	MES	1.01-2.0	+	-	III
38	60/M	MLA	1.01-2.0	-	+	II
39	60/V	MES	≤1	-	-	I
40	57/M	MES	≤1	-	-	I
41	55/V	MES	2.01-4.0	+	-	III

MES, Melanoma de extensión superficial; MLM, Melanoma léntigo maligno; MLA, Melanoma lentiginosoacral; ND, no datos; V, Varón, y M, Mujer; * Estadio clínico según criterios de la AJCC.

En primer lugar, se determinó el número total de linfocitos T en sangre periférica tanto de pacientes sin metástasis (estadios I-II) como de pacientes con metástasis (estadio III) y también en individuos sanos. En todos los grupos se detectó un número similar de linfocitos T CD8⁺ (Tabla 36). Además, se evaluó el grado de activación de los linfocitos T CD8⁺ valorando la expresión en su membrana del marcador de activación HLA-DR y se observó que los linfocitos T CD8⁺ de pacientes libres de metástasis presentaban un mayor grado de activación ya que en estos pacientes un mayor número células T CD8⁺ expresaban el antígeno HLA-DR en su membrana; sin embargo, este aumento en la expresión de HLA-DR comparada con la observada en linfocitos T CD8⁺ de la población control no alcanzó significación estadística (157 ± 19 vs. 114 ± 14 ; $P > 0.05$, test *t*-student).

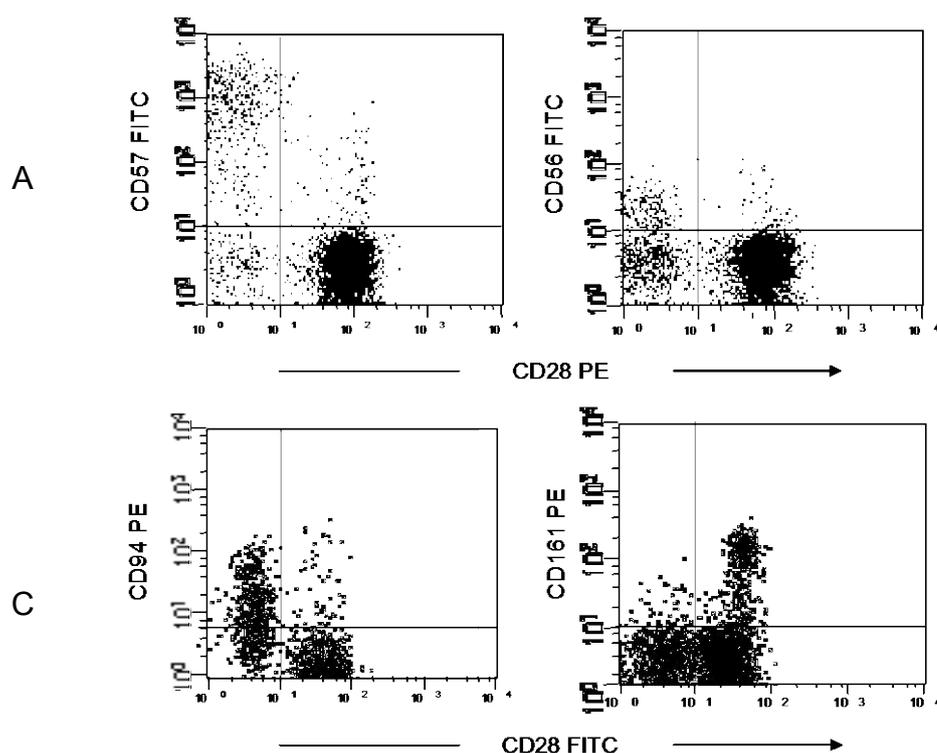


Figura 33. Esquema del protocolo de marcaje para el análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica. El estudio se realizó mediante citometría de flujo seleccionando la población de linfocitos T CD8⁺ del total de linfocitos T de sangre periférica. A, representación de la coexpresión en membrana de CD28 frente CD57; B, representación de la coexpresión en membrana de CD28 frente CD56; C, representación de la coexpresión en membrana de CD28 frente CD94 y D, representación de la coexpresión en membrana de CD28 frente CD161.

El estudio de la molécula coestimuladora CD28 sobre linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica demostró la existencia de un aumento de la subpoblación de células T que no expresaban esa molécula (T CD8⁺CD28⁻) en pacientes sin metástasis. De hecho, el aumento global observado de las células T CD8⁺CD28⁻ se debió principalmente a un incremento de la subpoblación de células T activadas CD8⁺CD28⁻DR⁺, mientras que el número de células T activadas CD8⁺CD28⁺DR⁺ estaba representado de forma similar en pacientes e individuos sanos. En conjunto, la subpoblación de células T CD8⁺CD28⁻DR⁺ estaba significativamente aumentada respecto a la subpoblación de células T CD8⁺CD28⁺DR⁺ en pacientes sin metástasis (105 ± 16 vs. 52 ± 5 ; $P = 0.005$, test *t*-student), mientras que ambas subpoblaciones de células T estaban igualmente representadas en el grupo control (62 ± 10 vs. 52 ± 6 ; $P > 0.05$, test *t*-student) y en los pacientes con metástasis (49 ± 13 vs. 37 ± 9 ; $P > 0.05$, test *t*-student).

Respecto a la expresión de NKR sobre células T CD8⁺ en sangre periférica de pacientes sin metástasis respecto a los controles no se observaron diferencias significativas, aunque las células que expresaban CD57, CD56 o CD94 estaban más representadas en este grupo de pacientes (Tabla 36). Cuando el estudio de las células T CD8⁺ que expresaban los receptores NKR fue realizado de acuerdo a la coexpresión no de la molécula CD28, pudo confirmarse que la expresión de dichos receptores era más frecuente en las células T con fenotipo CD8⁺CD28⁻ que en las células T CD8⁺CD28⁺ tanto en pacientes como en controles, como previamente había sido publicado (Casado et al. 2005; Speiser et al. 1999). Sin embargo, en el grupo control la molécula CD161 se expresaba más frecuentemente en la subpoblación de células T CD8⁺ con fenotipo CD8⁺CD28⁺ respecto a la subpoblación CD8⁺CD28⁻ (37 ± 4 vs. 20 ± 5 ; $p < 0.0001$, test *t*-student) siendo esta diferencia muy significativa. Por el contrario, en pacientes sin metástasis dicha molécula estaba igualmente representada en las subpoblaciones de células T CD8⁺CD28⁻ y T CD8⁺CD28⁺ (30 ± 6 vs. 28 ± 3 ; $P > 0.05$, test *t*-student). Curiosamente, en los pacientes con metástasis se observaba una expresión de CD161 similar a la observada en los controles, con un aumento de la expresión de esta molécula en la población T CD8⁺CD28⁺ (13 ± 4 vs. 36 ± 7 ; $P > 0.05$, test *t*-student) pero no se alcanzó

significación estadística debido al pequeño número de individuos pertenecientes a este grupo.

Tabla 36. Expresión de HLA-DR, CD57, CD56, CD94, CD161 en linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica en controles sanos y pacientes con melanoma

	Grupo control	Pacientes con melanoma	
	células/ μ l [n = 39]	No metástasis (estadios I-II)	Metástasis (estadio III)
		células/ μ l [n = 35]	células/ μ l [n = 6]
Células T CD8⁺			
Células T CD8 ⁺ totales	412 \pm 33	430 \pm 39	358 \pm 60
T CD8 ⁺ CD28 ⁺	267 \pm 21	237 \pm 18	242 \pm 39
T CD8 ⁺ CD28 ⁻	145 \pm 23	208 \pm 34	115 \pm 35
Estatus de activación			
Total T CD8 ⁺ DR ⁺	114 \pm 14	157 \pm 19	86 \pm 20
T CD8 ⁺ CD28 ⁺ DR ⁺	52\pm6^a	52\pm5^b	37 \pm 9
T CD8 ⁺ CD28 ⁻ DR ⁺	62 \pm 10	105 \pm 16	49 \pm 13
Células T CD8⁺NKR⁺			
T CD8 ⁺ CD57 ⁺ totales	132 \pm 20	178 \pm 25	98 \pm 30
T CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	14 \pm 2	18 \pm 2	13 \pm 5
T CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	118 \pm 20	160 \pm 25	85 \pm 27
T CD8 ⁺ CD56 ⁺ totales	65 \pm 11	89 \pm 25	53 \pm 12
T CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD56 ⁺	14 \pm 2	14 \pm 3	20 \pm 2
T CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD56 ⁺	52 \pm 10	75 \pm 23	33 \pm 13
T CD8 ⁺ CD94 ⁺ totales	109 \pm 17	136 \pm 24	54 \pm 12
T CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD94 ⁺	21 \pm 2	20 \pm 3	13 \pm 3
T CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD94 ⁺	88 \pm 15	113 \pm 23	41 \pm 9
T CD8 ⁺ CD161 ⁺ totales	57 \pm 6	59 \pm 7	49 \pm 7
T CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD161 ⁺	37\pm4^c	28\pm3^d	36 \pm 7
T CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD161 ⁺	20 \pm 5	30 \pm 6	13 \pm 4

El número de células está representado por la media \pm SEM, los valores de *P* fueron determinados mediante el test *t*-student. ^a, T CD8⁺CD28⁺DR⁺ vs. CD8⁺CD28⁻DR⁺ en grupo control, *P* > 0.05; ^b, T CD8⁺CD28⁺DR⁺ vs. CD8⁺CD28⁻DR⁺ en no metástasis, *P* = 0.005; ^c, T CD8⁺CD28⁺CD161⁺ vs. CD8⁺CD28⁻CD161⁺ en grupo control, *P* < 0.0001; ^d, T CD8⁺CD28⁺CD161⁺ vs. CD8⁺CD28⁻CD161⁺ en no metástasis, *P* > 0.05.

En el grupo de pacientes con metástasis (estadio III), el número de células T CD8⁺ que expresaban NKR analizados en este estudio estaba menos representado que

en el grupo de pacientes sin metástasis (estadios I-II) e incluso que en el grupo control (Tabla 36). En línea con estos resultados, el análisis del antígeno HLA-DR reveló que el número de células T CD8⁺CD28⁻DR⁺ activadas también estaba disminuido en pacientes con metástasis respecto a los pacientes sin metástasis e individuos sanos, pero en este caso las diferencias no alcanzaron significación estadística.

10. ESTUDIO DE LOS RECEPTORES KIR2D (CD158A/H Y CD158B/J) EN LINFOCITOS T CD8⁺ Y CÉLULAS NK CD56⁺

El análisis fenotípico de linfocitos T CD8⁺ que expresaban NKR realizado sobre las mencionadas series de 41 pacientes (Tabla 35) y de 39 individuos sanos, se amplió para valorar la expresión de los receptores KIR2D tanto sobre linfocitos T CD8⁺ y además se completó con su análisis sobre células NK CD56⁺. Como en el apartado anterior, también se optimizó un protocolo de marcado de células de sangre periférica para su análisis mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas CD158a/h (KIR2DL1/S1) y CD158b/j (KIR2DL2/3/S2). Como se refleja en la Figura 34, las moléculas CD158a/h y CD158b/j se expresaban en la membrana de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD28⁻ y en la de la población de células NK con baja expresión de CD56 (CD56^{+dim}) tanto en individuos sanos como en pacientes.

La comparación de la expresión de estos KIR en la subpoblación T CD8⁺CD28⁻ reveló que las células de esta subpoblación que expresaban CD158a/h o CD158b/j estaba aumentada en pacientes con melanoma sin metástasis respecto a la población control (14 ± 7 vs. 8 ± 3 y 33 ± 7 vs. 23 ± 5 , respectivamente y $P > 0.05$, test *t*-student); no obstante, estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 37). Cuando se analizaron las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ que expresaban receptores KIR2D dentro del grupo de pacientes con metástasis se observó que el número de células T con fenotipo CD8⁺CD28⁻CD158a/h⁺(KIR2DL1/S1) estaba incrementado con respecto al detectado en

controles (15 ± 7 vs. 8 ± 3 ; $P > 0.05$, test *t*-student) pero era similar al del grupo de pacientes sin metástasis (15 ± 7 vs. 14 ± 7 ; $P > 0.05$, test *t*-student); no obstante tampoco se alcanzó significación estadística. Este resultado contrastaba con el obtenido para la células T $CD8^+CD28^-CD158b/j^+$ (KIR2DL2/3/S2) pues esta subpoblación aparecía disminuida en los pacientes con metástasis respecto al grupo de pacientes sin metástasis (14 ± 8 vs. 33 ± 7 ; $P > 0.05$, test *t*-student) y los controles sanos (14 ± 8 vs. 23 ± 5 ; $P > 0.05$, test *t*-student); no obstante, estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 37).

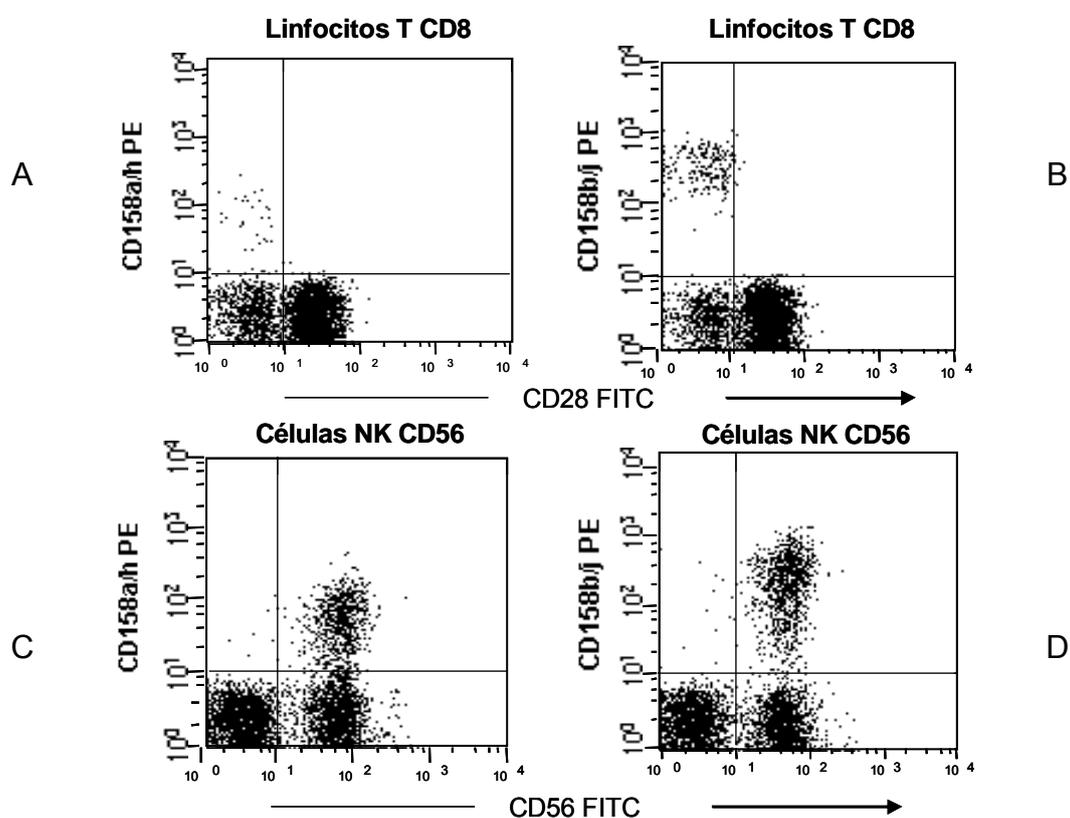


Figura 34. Subpoblaciones de linfocitos T $CD8^+$ y células NK $CD56^+$ que expresan las moléculas $CD158a/h$ (KIR2DL1/S1) y $CD158b/j$ (KIR2DL2/3/S2). El análisis se realizó mediante citometría de flujo sobre linfocitos T $CD8^+$ y células NK $CD56^+$ de sangre periférica. A, coexpresión en membrana de CD28 frente CD158a/h en linfocitos T $CD8^+$; B, coexpresión en membrana de CD28 frente CD158b/j en linfocitos T $CD8^+$; C, expresión de CD158a/h en células NK $CD56^{dim}$; D, expresión de CD158b/j en células NK $CD56^{dim}$.

En cuanto al análisis de las células NK tanto el número total de células NK CD56⁺ como el de células NK CD56⁺CD158a/h⁺(KIR2DL1/S1) aumentaba significativamente en pacientes sin metástasis con respecto a controles (285 ± 22 vs. 207 ± 16, *P* = 0.005 y 86 ± 15 vs. 47 ± 6; *P* = 0.004, respectivamente), mientras que el número de células NK CD56⁺CD158b/j⁺(KIR2DL2/3/S2) en este grupo de pacientes fue similar al del grupo de individuos sanos (89 ± 9 vs. 84 ± 10) como se observa en la Tabla 37. Cuando las células NK positivas para las moléculas que constituyen receptores KIR2D fueron analizadas en pacientes con metástasis, se encontró que el número de células NK que expresaba CD158a/h(KIR2DL1/S1) estaba disminuido en pacientes con metástasis con respecto a los pacientes sin metástasis (269 ± 45 vs. 285 ± 22; *P* = 0.005), aunque seguía aumentado respecto a controles (269 ± 45 vs. 207 ± 16; *P* = 0.004). Sin embargo, las células NK positivas para CD158b/j estaban disminuidas en el grupo de pacientes con metástasis con respecto al grupo de pacientes sin metástasis o individuos sanos. No obstante, las diferencias anteriormente descritas respecto al grupo de pacientes con metástasis no fueron significativas.

Tabla 37. Expresión de moléculas CD158a/h o CD158b/j en linfocitos T CD8⁺ y NK CD56^{dim} de sangre periférica en controles sanos y pacientes con melanoma

	Grupo control	Pacientes con melanoma	
		No metástasis (estadios I-II)	Metástasis (estadio III)
		células/ μ l [n = 32]	células/ μ l [n = 6]
Células T CD8⁺			
TCD8 ⁺ CD28 ⁺ CD158a/h ⁺	-	-	-
TCD8 ⁺ CD28 ⁻ CD158a/h ⁺	8 \pm 3	14 \pm 7	15 \pm 7
TCD8 ⁺ CD28 ⁺ CD158b/j ⁺	-	-	-
TCD8 ⁺ CD28 ⁻ CD158b/j ⁺	23 \pm 5	33 \pm 7	14 \pm 8
Células NKCD56⁺			
Células NKCD56 ⁺ totales	207 \pm 16 ^a	285 \pm 22 ^a	269 \pm 45
NKCD56 ⁺ CD158a/h ⁺	47 \pm 6 ^b	86 \pm 15 ^b	59 \pm 17
NKCD56 ⁺ CD158b/j ⁺	84 \pm 10	89 \pm 9	76 \pm 20

El número de células está representado por la media \pm SEM. Los valores de *P* se calcularon mediante ANOVA y el test de Kruskal-Wallis. ^a, no metástasis vs. controles; *P* = 0.005; ^b, no metástasis vs. controles, *P* = 0.004.

11. NIVEL DE EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD158A/H Y CD158B/JEN LINFOCITOS T CD8⁺ Y CÉLULAS NK CD56⁺

La proporción de receptores KIR2D en la membrana de las células estudiadasse determinó mediante citometría de flujo analizandolos cambios en la intensidad media de fluorescencia (IMF) que emitían las moléculas CD158a/h y CD158b/j tanto en linfocitos T CD8⁺CD28⁻ como en células NK CD56⁺. El estudio se realizó tanto en pacientes como en controles comparando la IMF de dichas moléculas (Figura 35).

Sobre los linfocitos T CD8⁺ la molécula CD158a/h estaba expresada con la misma intensidad en las células procedentes de los pacientes sin metástasis, grupos I y II (grupo I-II), y pacientes con metástasis o grupo III así como en el grupo control (Figura 35A). Por el contrario, como se puede observar en la Figura 35B, cuando la

IMF de la molécula CD158a/h fue determinada sobre células NK se pudo observar un aumento significativo de esta molécula en pacientes del grupo III comparado con el grupo de pacientes libres de metástasis (grupo I-II) y con el grupo control ($P = 0.04$ y $P = 0.03$, respectivamente). Sin embargo, la intensidad de expresión de CD158a/h sobre células NK fue similar en pacientes sin metástasis y controles. En el caso de la molécula CD158b/j, y en claro contraste con lo que ocurría con la expresión de CD158a/h en células NK, no se encontraron diferencias significativas en la IMF sobre linfocitos T CD8⁺ ni sobre las células NK CD56⁺ cuando se compararon los pacientes con metástasis con los que no presentaban metástasis, ni cuando se compararon ambos grupos de pacientes con los controles (Figura 35 C, D).

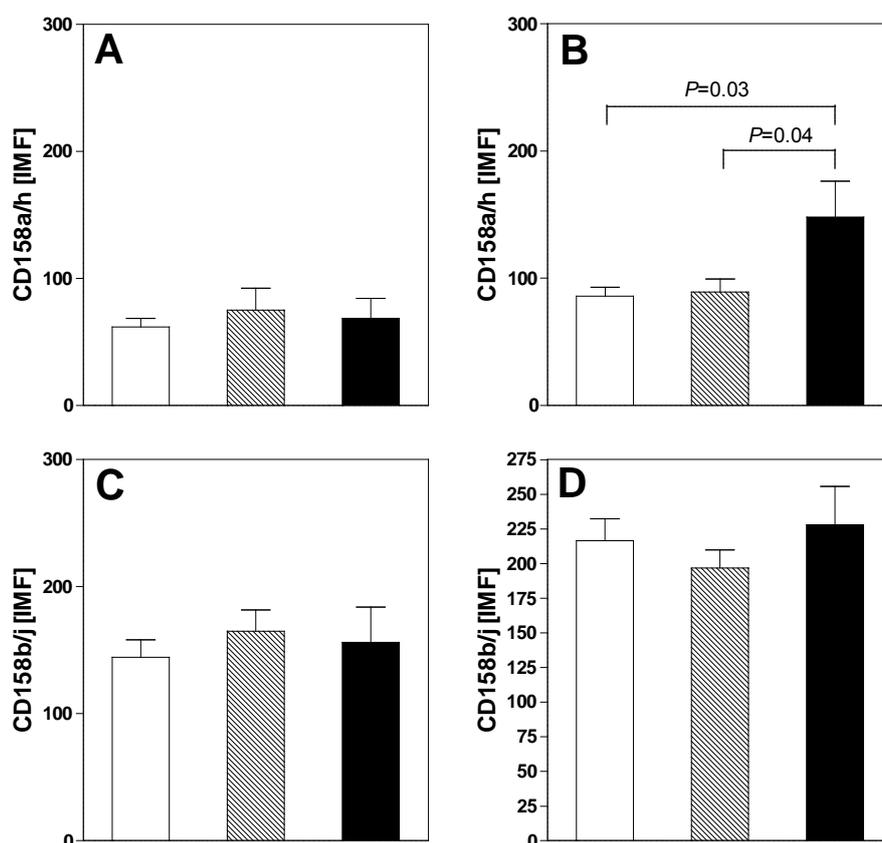


Figura 35. IMF de las moléculas CD158a/h y CD158b/j sobre linfocitos T CD8⁺ y células NK CD56⁺. A, valores de IMF de CD158a/h en linfocitos T CD8⁺CD28⁻; B, valores de IMF de CD158a/h en células NK CD56⁺; C, valores de IMF de CD158b/j en linfocitos T CD8⁺CD28⁻; D, valores de IMF de CD158b/j en células NK CD56⁺. Las columnas y barras representan la media \pm SEM. Los valores de P fueron calculados mediante ANOVA y el test de Kruskal-Wallis.

12. ANÁLISIS DE LINFOCITOS T CD8⁺CD28⁻ Y CÉLULAS NK CD56⁺ QUE EXPRESABAN CD158A/H O CD158B/J EN INDIVIDUOS CON DIFERENTES ALOTIPOS Y GENOTIPOS HLA-C

Los siguientes análisis estuvieron dirigidos a examinar las células T CD8⁺CD28⁻ y NK CD56⁺, que expresan las moléculas CD158a/h (KIR2DL1/S1) o CD158b/j (KIR2DL2/3/S2), procedentes de la sangre periférica de los pacientes libres de metástasis descritos en la Tabla 35 y los 39 individuos sanos, todos ellos portadores de diferentes alotipos HLA-C. Para ello, tanto los pacientes como los controles fueron genotipados para este locus y clasificados en función del dimorfismo en la posición 80 de la cadena $\alpha 1$ del HLA-C según se describe en material y métodos y se muestra en la Tabla 38.

En función del mencionado polimorfismo en HLA-C se clasificaron como grupo C1 a aquellos alelos que portaban "Asn" en la posición 80, también denominado "N", incluyendo los alelos HLA-C*01, HLA-C*03, HLA-C*07, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14 y HLA-C*1601 y como grupo C2, se incluyeron los alelos HLA-C que llevaban "Lys" en esa posición, también denominado "K", que comprende los alelos HLA-C*02, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*15, HLA-C*1602, HLA-C*17 y HLA-C*18. Además, los pacientes y los controles se clasificaron según su genotipo HLA-C y de acuerdo al dimorfismo mencionado en tres grupos; a saber, individuos homocigotos para los alelos del grupo C2 (HLA-C^{Asn80/Asn80}) o N/N, individuos homocigotos para los alelos del grupo C1 (HLA-C^{Lys80/Lys80}) o K/K e individuos heterocigotos (HLA-C^{Asn80/Lys80}) o N/K (Tabla 38). Entre los controles se encontraron 14 N/N, 6 K/K, 18 NK y de 1 no se obtuvieron datos y entre los pacientes 11 eran N/N, 10 K/K y 20 N/K.

Como se muestra en la Figura 36 A, en el caso del grupo control la subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD28⁻CD158a/h⁺ aparecía aumentada en los individuos homocigotos para el grupo C2 (HLA-C^{Lys80/Lys80}) con respecto a los homocigotos del grupo C1 (HLA-C^{Asn80/Asn80}), mientras que el número de estas

células en individuos heterocigotos (HLA-C^{Asn80/Lys80}) fue intermedio. Sin embargo, las diferencias observadas entre grupos no fueron significativas.

Tabla 38. Alelos y alotipos HLA-C en controles sanos y pacientes con melanoma y

Grupo control [n = 39]	Genotipo HLA-C*	Dimorfismo HLA-C en posición 80	Pacientes con melanoma [n = 41]	Genotipo HLA-C*	Dimorfismo HLA-C en posición 80
1	ND	ND	1	07, 12	N/N
2	07, 04	N/K	2	06, 03	N/K
3	08, 08	N/N	3	15, 16	N/K
4	04, 12	N/K	4	04, 07	N/K
5	02, 07	N/K	5	01, 16	N/N
6	05, 17	K/K	6	05, 05	K/K
7	07, 07	N/N	7	02, 07	N/K
8	01, 07	N/K	8	02, 06	K/K
9	03, 06	N/K	9	01, 07	N/N
10	05, 07	N/K	10	03, 08	N/N
11	15, 15	K/K	11	08, 17	N/K
12	03, 07	N/K	12	03, 04	N/K
13	03, 04	N/K	13	03, 04	N/K
14	16, 17	N/K	14	05, 08	N/K
15	03, 12	N/N	15	02, 04	K/K
16	04, 07	N/K	16	08, 12	N/N
17	07, 07	N/N	17	07, 16	N/K
18	01, 03	N/N	18	06, 07	N/K
19	02, 05	K/K	19	05, 16	N/K
20	07, 07	N/N	20	04, 12	N/K
21	07, 16	N/N	21	05, 06	K/K
22	04, 04	K/K	22	05, 07	N/K
23	12, 05	N/K	23	04, 15	K/K
24	12, 12	N/N	24	02, 07	N/K
25	03, 03	N/N	25	08, 14	N/N
26	03, 12	N/N	26	06, 12	N/K
27	05, 08	N/K	27	12, 17	N/K
28	03, 07	N/N	28	03, 04	N/K
29	05, 07	N/K	29	02, 05	K/K
30	16, 08	N/N	30	06, 08	N/K
31	02, 07	N/K	31	01, 07	N/N
32	05, 08	N/K	32	07, 08	N/N
33	07, 16	N/N	33	12, 14	N/N
34	07, 15	N/K	34	15, 17	K/K
35	03, 07	N/N	35	07, 08	N/N
36	05, 07	N/K	36	02, 02	K/K
37	04, 16	N/K	37	04, 04	K/K
38	04, 15	K/K	38	06, 12	N/K
39	05, 06	K/K	39	12, 12	N/N
			40	06, 15	K/K
			41	04, 16	N/K

Abreviaturas: ND, no datos; N, Asparagina (Asn); K, Lisina (Lys). Los pacientes 5, 20, 28, 36, 37 y 41 pertenecen al estadio III, los pacientes 3,22, 31, 32 y 38 son del estadio II y el resto del estadio I.

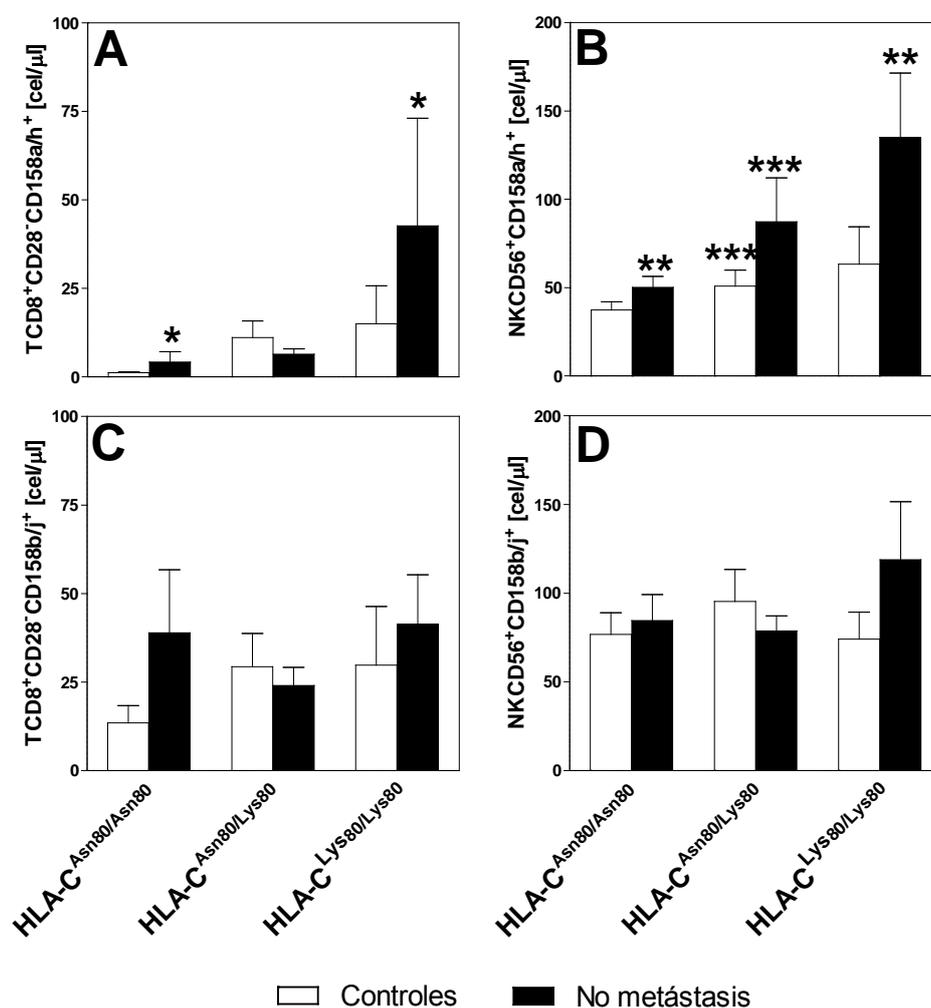


Figura 36. Linfocitos T CD8⁺CD28⁻ y células NK CD56⁺ que expresan CD158a/h y CD158b/j en diferentes alotipos HLA-C. Análisis realizado en individuos homocigotos para HLA-C^{Lys80}, individuos heterocigotos HLA-C^{Asn80/Lys80} e individuos homocigotos para HLA-C^{Asn80}. A, número de linfocitos T CD8⁺CD28⁻CD158a/h⁺; B, número de células NK CD56⁺CD158a/h⁺; C, linfocitos T CD8⁺CD28⁻CD158b/j⁺; D, células NK CD56⁺CD158b/j⁺. Las columnas y barras representan la media ± SEM. Los valores de *P* fueron determinados mediante ANOVA y el test de Kruskal-Wallis: **P* = 0.007 pacientes homocigotos para HLA-C^{Lys80} vs. pacientes homocigotos para HLA-C^{Asn80} (n = 7 y 11, respectivamente); ***P* = 0.03 pacientes homocigotos para HLA-C^{Lys80} vs. pacientes homocigotos para HLA-C^{Asn80}, y mediante el test *t*-student: ****P* = 0.04 pacientes vs. controles, ambos heterocigotos HLA-C^{Asn80/Lys80} (n = 17 y 18, respectivamente).

Por el contrario, como se observa en la Figura 36A, en el grupo de pacientes con melanoma las comparaciones entre individuos homocigotos y heterocigotos para alotipos HLA-C (HLA-C^{Asn80/Asn80}, HLA-C^{Lys80/Lys80} y HLA-C^{Asn80/Lys80}) revelaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células que expresaban CD158a/h (*P* = 0.009, análisis ANOVA), las cuales fueron particularmente

relevantes cuando se compararon entre sí los dos grupos de pacientes homocigotos HLA-C^{Asn80/Asn80} y HLA-C^{Lys80/Lys80} ($P = 0.007$).

Con respecto a las células NK CD56+ que expresan CD158a/h (Figura 36 B), las comparaciones realizadas entre individuos sanos pertenecientes a los diferentes genotipos HLA C no revelaron diferencias significativas. Sin embargo, y como previamente se había visto para los linfocitos T CD8+CD28-, el número de células NK CD56+CD158a/h+ estaba también significativamente aumentado ($P = 0.03$) en los pacientes homocigotos del grupo C2 (HLA C^{Lys80/Lys80}) respecto al observado en los pacientes homocigotos del grupo C1 (HLA C^{Asn80/Asn80}).

Por otra parte, también se observaron diferencias cuando los pacientes heterocigotos HLA-C^{Asn80/Lys80} se compararon con los controles sanos heterocigotos HLA-C^{Asn80/Lys80}; de hecho, el número de células NK CD56⁺CD158a/h⁺ detectado en pacientes heterocigotos fue significativamente más alto que el encontrado en individuos heterocigotos sanos ($P = 0.04$, test *t*-student desapareado de dos colas).

Es de destacar que, en contraste a los diferencias observadas en el número de células que expresan el receptor CD158a/h, las variaciones detectadas tanto en células T como NK positivas para el receptor CD158b/j fueron menores y no alcanzaron significación estadística (Figura 36 C y D).

Por último, para evaluar el nivel de expresión de los receptores KIR, y dado que no se habían observado cambios significativos en las células positivas para CD158b/j, se realizó un análisis de IMF de la molécula CD158a/h. Este análisis reveló que la IMF de CD158a/h en linfocitos T CD8⁺CD28- y en células NK CD56⁺ era similar en pacientes y controles, pertenecientes a diferentes grupos HLA-C. Además, cuando la IMF de CD158a/h observada en cada grupo HLA-C de pacientes fue comparada con la IMF de los correspondientes grupos de controles tampoco se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

1. DISCUSIÓN

El presente trabajo es el resultado de un proyecto de investigación traslacional y multidisciplinar que se diseñó con el objetivo de conocer si existen aspectos inmunológicos, bien sean inmunogenéticos, moleculares o celulares, como los mediados por las moléculas HLA o ciertas poblaciones celulares del sistema inmunitario, capaces de influir en la susceptibilidad o resistencia frente al desarrollo de melanoma y en el pronóstico de esa enfermedad. Este estudio se ha realizado sobre un total de 530 individuos caucásicos, compatibles en edad y sexo, procedentes de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, de los cuales, 356 eran individuos sanos en calidad de grupo control y 174 fueron pacientes con diagnóstico histológico de melanoma cutáneo maligno, en estadios clínicos y con características clínicas diferentes en el momento del diagnóstico.

En cuanto a los objetivos primero, segundo y tercero, relativos a los estudios inmunogenéticos, se analizó el polimorfismo de moléculas HLA-I clásicas codificadas por los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C, con una especial referencia a las de este último locus y las portadoras de del epitoma HLA-Bw4 y entre las variantes alélicas no clásicas se evaluaron las del locus HLA-E. Adicionalmente, se contempló el posible papel de las moléculas de HLA de clase II, HLA-DR y HLA-DQ.

Para la evaluación de la inmunidad celular en melanoma se analizaron las poblaciones citotóxicas de linfocitos T CD8⁺ y células NK, así como la expresión de receptores NKR en los linfocitos T CD8⁺ y la de los KIR en ambas estirpes celulares e igualmente se procedió a analizar el repertorio de células que expresaban los receptores KIR2D en individuos con distintos alotipos y genotipos HLA-C, dada su particular relevancia en la activación o inhibición de los mecanismos de citotoxicidad ejercidos por linfocitos T CD8⁺ y células NK.

La actividad antitumoral del sistema inmunitario se relaciona principalmente con la acción efectora citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y de las células NK (Jovic

et al., 2001; Lee et al., 2004; Oble et al., 2009; Sengupta et al., 2010), Es bien conocido el papel relevante de los antígenos HLA-I en el reconocimiento antigénico y la respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T CD8⁺, pero la actividad citotóxica de las células NK también se ve influenciada en gran medida por la expresión de estas moléculas HLA-I en las células diana. Además, se ha descrito que el papel de los antígenos HLA-I, en particular el de los alelos HLA-C, ciertos alelos HLA-A (HLA-A3 y HLA-A11) y el del epítipo HLA-Bw4, que por su importancia como ligandos de los receptores KIR son cruciales para la correcta función citotóxica o inmunomoduladora de ambas estirpes celulares (Parham P and McQueen KL, 2003; Rajalingam, 2011).

Hasta la fecha, los estudios de la asociación de HLA y melanoma u otros tumores sólidos son bastante limitados. Además, con respecto al melanoma, en muchos casos, los datos publicados son inconsistentes o contradictorios, por lo que no existe un consenso sobre la asociación HLA con susceptibilidad o resistencia a esta enfermedad. Por ello, uno de los objetivos fundamentales de este trabajo ha sido investigar la posible implicación del HLA en el melanoma atendiendo especialmente a su influencia en la susceptibilidad y en el pronóstico de esta enfermedad.

En cuanto al papel de los alelos HLA-A, nuestros hallazgos al considerar la serie total de pacientes, a diferencia de lo que ocurre cuando se contemplan los distintos grupos y situaciones clínicas desagregadas, no son informativos sobre la susceptibilidad general a padecer melanoma ni tampoco respecto a la evolución clínica. Sin embargo, al considerar los distintos grupos histológicos, el alelo HLA-A1 estaba menos representado en el grupo de MES, una de las variantes menos agresivas de esta enfermedad, lo que sugiere que este alelo puede representar un factor de protección frente al padecimiento de este tipo de melanoma. No obstante, sería aconsejable extender el estudio a una serie más amplia para confirmar si realmente el alelo HLA-A1, puede relacionarse con el tipo MES de melanoma y, proteger frente a esta modalidad de la enfermedad. Más precisamente porque la representación de HLA-A1 en nuestra cohorte de pacientes contradice lo reportado por Luongo (2004), quién describe una alta representación del alelo HLA-A1 en pacientes italianos con MES, asociada además a una buena evolución clínica, aspecto

que podría ser reflejo de un efecto protector de este alelo de la enfermedad, posiblemente debido a una mayor eficacia en la presentación de antígenos tumorales. Por otra parte, el trabajo de Naumova (2005) también sugiere un ligero incremento de la frecuencia de HLA-A1 en pacientes con melanoma, aunque sus datos no llegan a ser significativos y el texto tampoco indican la relación existente con las distintas entidades histopatológicas o con la evolución clínica del tumor; además, sus resultados están basados en cohortes de pacientes y controles mucho más reducidas que la incluida en el presente trabajo.

Cuando se evaluó el papel del locus HLA-A, considerando las características clínicas del melanoma, el antígeno HLA-A3 también parecía proteger de la ulceración en la lesión primaria, puesto que su frecuencia en este caso y en el de pacientes con metástasis estaba reducida. Un hallazgo que sugiere que HLA-A3 pueda considerarse como un indicador de buen pronóstico. Igualmente, la menor representación HLA-A28 en pacientes cuyo tumor tuviese un grosor > 1mm, sugiere que este antígeno puede mediar en la buena evolución del melanoma y ejercer como factor protector evitando el crecimiento de la lesión tumoral.

En relación inversa con todo lo anterior, los datos de nuestra serie muestran que HLA-A24 podría constituir un factor de mal pronóstico en melanoma, pues su presencia aparecía sobrerrepresentada en pacientes que desarrollaban metástasis. Resultado este último que viene a confirmar lo descrito previamente por Schachter (1997), cuyo grupo también encontró la existencia de una asociación entre la presencia HLA-24 y melanoma con metástasis en un estudio realizado sobre una población de pacientes judíos.

Respecto al locus HLA-B, concretamente el antígeno HLA-B62, parece mediar en una evolución negativa del melanoma, ya que el único portador de este alelo encontrado en nuestra serie padecía un tumor de tipo MN, una entidad más agresiva que el MES, aunque en este caso no presentaba ni ulceración ni metástasis. De modo general, los hallazgos relativos al papel del locus HLA-B en la serie aquí investigada, difieren de los descritos anteriormente en una población japonesa donde se indica que HLA-B13 se asocia con el melanoma y en concreto con el subtipo MN o también que HLA-B61 resulta disminuido en la población enferma y que

HLA-B51 aparece representado en el 50% de melanoma del tipo MLA, mientras está ausente en el melanoma de tipo MN (Muto et al., 1996; Ichimiya et al., 1996). No obstante, hay que destacar que la serie que ellos estudian es mucho menor y, además, que en la época de ese estudio la metodología era menos precisa que la utilizada en el presente trabajo y, muy especialmente, que entre la población japonesa y la nuestra existen claras diferencias étnicas que se traducen en diferencias de representación de alelos y antígenos codificados por el sistema HLA entre ambas poblaciones y eso puede modificar su relación con la enfermedad en ambas etnias. Contrariamente, a lo indicado para la población japonesa, Luongo (2004) describe una asociación negativa entre melanoma y HLA-B13 y HLA-B44. Por otro lado, nuestro estudio tampoco revela ninguna relación entre melanoma y HLA-B38, tal como ha sido previamente descrito en una población judía (Schachter et al., 1997).

En cuanto a la correlación de antígenos HLA-B con las características clínicas del melanoma en nuestra serie, el hallazgo relacionado con el hecho de que HLA-B27 esté más representado en pacientes con un tumor de grosor > 1mm, lo que si se consigue confirmar con datos más significativos en una serie más amplia podría llevar a considerar que este antígeno pueda constituir un indicador de mala evolución del melanoma. Más interesante es quizás, la observación de que la frecuencia de HLA-B35 aparezca aumentada significativamente en pacientes con metástasis, ya que sugiere que HLA-B35 puede tener un papel relevante sobre la mala evolución de la enfermedad, es decir, que sea un factor de mal pronóstico para el melanoma. Adicionalmente, también podría considerarse un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad el antígeno HLA-B53, dada su mayor representación en pacientes con ulceración en la lesión primaria y, en el mismo sentido, habría que contemplar que HLA-B55 y HLA-B61 podrían operar como factores de mal pronóstico, en función del aumentos de sus frecuencias en pacientes con metástasis, aunque el efecto de estos antígenos queda pendiente de una confirmación más precisa de su significación estadística en series más amplias. Por último, señalar que el aumento de frecuencia de HLA-B72 en pacientes con un grosor tumoral > 1mm, también sugiere que este antígeno pueda representar un factor de riesgo asociado con una mala evolución de la enfermedad.

Dada la importancia del epítipo HLA-Bw4, en tanto que ligando del receptor KIR3DL1 y, mediador en la educación de las células NK y de su actividad citotóxica o de la de las células T CD8⁺, esencialmente debido a que como las moléculas HLA-C presenta dimorfismo en la posición 80, se consideró interesante valorar su influencia en el melanoma. En este sentido, se revisó no solo el efecto posible del epítipo HLA-Bw4 sino también el de sus isomorfismo HLA-Bw4 (Thr80) y HLA Bw4 (Ile80) y de sus distintas combinaciones genotípicas en homo o heterocigosis, sin que en ningún caso, se pudiera establecer una correlación entre cualquiera de ellos y la susceptibilidad o resistencia al melanoma, ni tampoco con los subtipos histológicos o la evolución y pronóstico de la enfermedad. En conjunto estos resultados tampoco concuerdan con los publicados por Naumova (2005), indicando que el alotipo HLA Bw4^{Thr80} estaba menos representado en el grupo pacientes con metástasis, aun así, los datos de este trabajo no ofrecían diferencias estadísticamente significativas y las cohortes estudiadas por ellos fueron mucho más reducidas.

Dada la relevancia de los alelos del locus HLA-C por su capacidad para reconocer receptores KIR expresados tanto sobre linfocitos T como células NK y su importancia en la educación de células NK, uno de los objetivos de este estudio proponía explorar si algún alelo o alotipo HLA-C, en mayor o menor medida se correlacionaba con la susceptibilidad, protección, evolución o con el pronóstico de la enfermedad. Así, primero se evaluó la relación entre alelos HLA-C y el desarrollo de metástasis regional linfática en los pacientes de melanoma, lo que propició el hallazgo de una mayor frecuencia del alelo HLA-C*04 en pacientes que presentaron metástasis en el ganglio centinela, mientras esto no ocurría en pacientes sin metástasis, y por tanto, que este alelo podría favorecer una mala evolución del melanoma. Sin embargo, el diseño del trabajo no permitió asegurar si este alelo tenía un efecto *per se* o era ocasionado por el desequilibrio de ligamiento existente entre HLA-C*04 y HLA-B35 (Chertkoff et al., 1988), aunque si se pudo constatar que la significación de la asociación de HLA-C*04 y metástasis fue mayor que la observada para HLA-B35, lo que hace pensar que HLA-C*04 se relacione realmente con la aparición de metábasis.

Por el contrario, la menor representación del alelo HLA-C*07, en el tipo histológico MES pero no en el MN, hace pensar que HLA-C*07 infiere una menor susceptibilidad para el desarrollo de MES. Más aún, HLA-C*07 correlaciona positivamente con la protección frente a la migración del melanoma y la aparición de metástasis, hecho que le convierten en un factor candidato a ejercer un efecto protector frente a melanoma. En contraste, una vez que el desarrollo del melanoma haya tenido lugar, la presencia del alelo HLA-C*07 disminuye en las formas más benignas del melanoma, bien sea por un grosor $\leq 1\text{mm}$ del tumor o por ausencia de ulceración en la lesión primaria, lo que cuando menos cuestiona su papel protector en la progresión de la enfermedad.

Otro de los alelos HLA-C que puede ser asociado a una mejor evolución del melanoma es el alelo HLA-C*08, ya que ha resultado predominante en los melanomas con un grosor $\leq 1\text{mm}$ y también, en los pacientes que no presentaban ulceración en la lesión primaria y en los que no se detectó metástasis en el ganglio centinela.

Por el contrario, la sobrerrepresentación del alelo HLA-C*17 hallada en la población total de los pacientes con melanoma y también concretamente en el subtipo histológico MES, hace pensar que este alelo pueda predisponer a la enfermedad y por tanto podría considerarse como un factor de riesgo o de mayor susceptibilidad al melanoma. En cambio sobre la evolución del melanoma, la presencia de este alelo parece también conferir cierta protección frente al crecimiento vertical y frente a la ulceración, puesto que como se ha mencionado para el alelo HLA-C*08 su frecuencia aparece aumentada tanto en el grupo donde el tumor tenía $\leq 1\text{mm}$ de grosor como en el grupo que no presentaba ulceración en la lesión primaria. Además, también puede ser protector de la aparición de metástasis, ya que ningún paciente portador de este alelo desarrollo metástasis.

En fin, los datos sobre HLA-C, vienen a contradecir lo descrito por Naumova (2005) sobre el aumento de HLA-C*07 en pacientes de melanoma y la disminución de HLA-C*17 en esa misma serie. Aunque como ya se ha mencionado en dicho trabajo las variaciones de estos alelos no fueron estadísticamente confirmadas y sus cohortes eran mucho menores que las del analizadas en el presente trabajo, pero

tampoco se puede descartar que existan diferencias étnicas con respecto a la población española.

Continuando con el estudio de la posible implicación del locus HLA-C en el melanoma y tras estratificar los pacientes teniendo en consideración el dimorfismo en posición 80, y considerado el total de pacientes portadores del alotipo Asn80 (que define a los alelos integrantes del grupo C1), ya fueran homo o heterocigotos, la presencia de este alotipo parecía conferir algún tipo de protección frente al melanoma, en particular frente al tipo histológico MES y frente a la migración tumoral, pues este alotipo fue menos representativo en los grupos de MES (Tabla 6r) y metástasis (Tabla 14r). Sin embargo, curiosamente, en presencia de doble carga de Asn80 en pacientes homocigotos para este alotipo (Asn80/Asn80 o C1/C1), la probabilidad de ulceración en la lesión primaria era relevante, lo que cuestiona su beneficio en el pronóstico general.

En este sentido y, en virtud de la menor frecuencia de individuos portadores de Asn80 en los melanomas con un grosor ≤ 1 mm y en los que no presentaban ulceración en la lesión primaria, parece también que el melanoma una vez desarrollado pueda tener una evolución más agresiva. Este comportamiento recuerda el observado para el HLA-C*07 (un alelo del grupo C1 y por tanto con el epítipo Asn80) y, abunda sobre la posibilidad de que su efecto se deba precisamente a la presencia del epítipo Asn80 y que éste sea el factor condicionante de la peor evolución del tumor. Aún así, no es posible descartar fehacientemente que HLA-C*07 tenga “*per se*”, en su calidad de presentador de antígenos, un papel como factor de protección y que su función no se deba exclusivamente a su pertenencia al grupo C1. Por tanto, sería recomendable confirmar estos hallazgos en una serie de pacientes más amplia, máxime cuando el efecto protector de HLA-C*07, ha sido también descrito en una población española de nuestro ámbito geográfico en pacientes de carcinoma diferenciado de tiroides (Ríos et al., 2004). Más aún, tampoco se ha podido descartar que estos últimos datos relacionados con ulceración y grosor del tumor, sean reflejo de lo que acontezca en los otros subtipos histológicos no MES, minoritarios en nuestra serie.

En contraposición al epítipo Asn80, parece que ser portador en homocigosis del epítipo Lys80 (grupo C2 de HLA-C) predispone al desarrollo de melanoma (Tabla 6r) y, en particular al tipo MES, donde este alotipo es predominante. Más aun su presencia puede favorecer la migración tumoral pues es un alotipo predominante en pacientes con metástasis en el ganglio centinela y por ello, puede ser considerado como un factor de mal pronóstico (Tabla 14r). En cambio, curiosamente, en individuos con HLA-C^{Lys80} en homocigosis el aumento del grosor y a la aparición de ulceración en la lesión primaria parece estar protegido y, además, su sola presencia en heterocigosis, también resulta protectora frente a la ulceración. Recordemos aquí, que, entre los alelos HLA-C del grupo C2, el alelo HLA-C*04, era el más representativo en pacientes de melanoma con metástasis regional linfática, lo que le distinguía de los pacientes sin metástasis (ver Tabla 13r). Cabe por ello pensar que las correlaciones observadas en los portadores del alelo HLA-C*04, podrían estar influidas por su pertenencia al grupo C2 que es portador de Lys80, ya que cuando se estudiaron las cohortes excluyendo este alelo las asociaciones observadas con melanoma y su pronóstico no se veían afectado su valor estadístico (datos no mostrados). En este contexto, nuestros datos también discrepan de los publicados anteriormente (Naumova et al., 2005), donde se especificaba que los individuos homocigotos para Lys80 eran infrecuentes en pacientes con melanoma, mientras que la presencia en homocigosis del alotipo HLA-C^{Asn80} era más frecuente en los mismos. No obstante, habría que tener en cuenta las probables diferencias étnicas entre las dos poblaciones estudiadas, pues de hecho, la frecuencia observadas para los tres genotipos (C1/C1, C2/C2 y C1/C2) en de la población control búlgara difieren sensiblemente de la encontrada en nuestra cohorte de individuos sanos.

En resumen, se puede considerar que la presencia de HLA-C^{Asn80} y o del alelo HLA-C*07 sean factores que puedan conferir protección frente a la susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis, mientras que la homocigosis para HLA-C^{Lys80} comporte un factor de riesgo para la aparición de la enfermedad y la predisposición al desarrollo de metástasis.

Adicionalmente, parece que HLA-C^{Asn80} y de HLA-C^{Lys80}, actúen en sentido contrario en lo relativo al crecimiento del tumor y a la posibilidad de ulceración, pues

mientras la presencia del alotipo Asn80 se asocia a mayor grosor del tumor y a ulceración, la de Lys80 parece proteger frente al crecimiento vertical y a la aparición de ulceración en la lesión primaria. Esto podría indicar que los fenómenos observados sobre incremento de grosor y ulceración ocurran en tipos histológicos no MES; por eso, es necesario estudiar series más amplias para poder confirmar o descartar esta observación.

Esta asociación encontrada en los homocigotos HLA C^{Lys80} como predisponente a melanoma y a la aparición de metástasis puede explicarse en el contexto de posibles interacciones entre el epítipo Lys80 de las moléculas de HLA-C y sus receptores específicos expresados sobre células efectoras citotóxicas anti-tumorales (Al Omar et al., 2010; Al Omar et al., 2011). No obstante, la relevancia funcional de este hallazgo es difícil de evaluar ya que tanto las formas inhibitoras (KIR2DL1) como activadoras (KIR2DS1) pueden estar expresadas en la superficie de las células efectoras (Moretta et al., 1995), aunque es preciso destacar que las señales inhibitoras mediadas por receptores NK suelen ser dominantes respecto a las señales de activación. Además, las interacciones del epítipo Lys80 con sus correspondientes receptores son fuertes mientras que las mediadas por el epítipo Asn80 tienen una fuerza intermedia o débil (Parham, 2004; Igarashi et al., 2004; Parham, 2005; Vitale et al., 1995; Khakoo et al., 2004).

Es también un hecho a considerar que el gen que codifica la forma inhibitora KIR2DL1 está presente prácticamente en todos los individuos (Martin et al., 2002; Nikitina-Zake et al., 2004) y, eso haría que la progresión de la enfermedad pudiera ser facilitada en individuos homocigotos para HLA-C^{Lys80}, tras la inducción de un estado de tolerancia periférica contra el tumor (Vitale et al., 1995; Igarashi et al., 2004). Esta hipótesis viene apoyada por otros estudios previamente publicados, que revelan un efecto dominante de los ligandos de HLA-C del grupo C2 en presencia de su receptor inhibitor específico (Martin et al., 2002; Parham 2004; Fan et al., 2001; Hiby et al., 2004; Rajagopalan and Long 2005; Al Omar et al., 2011; Al Omar et al., 2011). Así pues, el papel protector del epítipo Asn80 podría derivar de que al establecer interacciones más débiles o intermedias con sus receptores, las señales de inhibición transmitidas serían así mismo más débiles e insuficientes para

contrarrestar las señales de activación existentes, por lo que la actividad citotóxica frente al tumor se vería facilitada o potenciada.

Tras la revisión de la relación entre alelos HLA-I clásicos y melanoma, se abordó la evaluación de los HLA de clase II con objeto de conocer si también podían asociarse la susceptibilidad, resistencia o pronóstico del melanoma, sobre todo por el hecho de estudios previamente publicados aportaban resultados inconsistentes o contradictorios.

Referido al total de la cohorte estudiada no hubo evidencia de asociación entre alelos de HLA clase II (HLA-DRB1 y HLA-DQB1) con la susceptibilidad o resistencia al melanoma. Sin embargo, estos alelos sí se consiguieron relacionar con el grosor tumoral y su propensión a ulceración, de manera que la presencia del alelo HLA-DRB1*01 o la del alelo HLA-DQB1*03:02 parecía predisponer a la aparición de ulceración en la lesión primaria, mientras que, contrariamente, los alelos HLA-DRB1*07 y HLA-DRB1*13 o el HLA-DQB1*06 parecían ejercer un efecto inverso y proteger de la ulceración, dada su menor representación en pacientes donde aparecía ulceración. Por último, la sobrerrepresentación HLA-DQB1*03:03 en el grupo de pacientes cuyo tumor medía >1mm de grosor sugería que este alelo podía ser un factor de riesgo para favorecer el crecimiento vertical del tumor. En cuanto al papel de los alelos HLA de clase II, los resultados que ofrece el presente trabajo confirman lo publicado previamente en otro grupo de pacientes de melanoma procedentes de nuestra misma área geográfica (Nagore et al., 2002) y curiosamente también los de la población japonesa (Kageshita et al., 1997) donde tampoco observan asociaciones relevantes entre melanoma y HLA de clase II. Hecho por otra parte plausible por la no directa interacción de las moléculas de clase II con las células citotóxicas que pueden mediar en la eliminación de células del tumor, aunque puedan tener un papel colaborador complementario implementando la producción de citoquinas u otros factores que redunde en una mejora de la respuesta inmunitaria frente al tumor.

Por otro lado, es de interés reseñar la debilidad de las asociaciones encontradas en nuestra serie para antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A y HLA-B) y alelos de clase II (HLA-DRB1 y HLA-DQB1) con la susceptibilidad a

desarrollar melanoma, su presentación clínica o su evolución, ya que no soportaron la corrección de Bonferroni. No obstante, es cierto que ellas muestran unas tendencias no desdeñables, máxime si como se ha mencionado al principio se tiene en cuenta que quizás esta corrección sea demasiado estricta y, lo que hace aconsejable no descartar que estas asociaciones puedan ser mejor confirmadas en futuros estudios sobre series más amplias. Reflexiones aparte, todo el estudio de HLA de esta serie concuerda con los informado en estudios realizados con pacientes italianos y Búlgaros (Lombardi et al., 1998; Naumova et al., 2005), que tampoco pudieron establecer relaciones claras entre los locus HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, o HLA-DQB1 y el desarrollo pronóstico del melanoma. En sentido contrario, en este estudio hay clara discrepancia con los resultados publicados por Lee (1994), pues no se confirma su afirmación de que el alelo HLA-DQB1*0301 se asociaba con mayor grosor del tumor primario y con la presencia de metástasis, ya fueran éstas regionales o viscerales. En modo similar, los datos de este trabajo viene a contradecir los previos de un estudio realizado en pacientes británicos, donde se indica que HLA-DQB1*0303 puede ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma y que HLA-DQB1*0301, sería un factor de mal pronóstico de la enfermedad (Bateman et al., 1998).

Por último, respecto a los análisis de loci HLA clásicos, como se ha señalado en párrafos precedentes, parece oportuno recordar, que las discrepancias observadas en las diferentes series de pacientes con melanoma podrían ser explicadas por las variaciones étnicas en las frecuencias de HLA y/o por la heterogeneidad de los factores genéticos y/o ambientales de las diferentes poblaciones estudiadas (Ghiorzo and Scarra, 2003)

Finalmente, destacar que dentro de los genes HLA no clásicos, es conocida la capacidad del locus HLA-E para reconocer receptores de tipo lectina, CD94/NKG2, expresados en células NK y algunas subpoblaciones linfocitos T, propiedad que puede redundar en el control y respuesta frente a tumores y, por ende, afectar o no a la susceptibilidad y al pronóstico del melanoma. Por esta razón en los pacientes de nuestra serie, se abordó también el análisis del polimorfismo en el locus HLA-E y el de los subgrupos basados en la sustitución no sinónima (R *versus* G) en la posición

107 del dominio alfa-2 del exón 3, porque esta aminoácido se sitúa en la zona de contacto con el receptor de la célula T.

Aunque se sabe que cierta líneas de melanoma expresan HLA-E (Marín et al., 2003) no se pudo establecer correlación directa alguna entre dichas variantes alélicas HLA-E o sus fenotipos con el melanoma cutáneo, pero si se pudo descartar por primera vez que este locus condicione positiva o negativamente la aparición o desarrollo de dicha enfermedad (M).

Un dato interesante de este trabajo, es que entre los individuos estudiados ninguno era portador del alelo HLA-E*0102, dato que difería de lo publicado en otra población española en la que el alelo HLA-E*0102 aparecía con una frecuencia del 10% (Gómez-Casado et al., 1997). Precisamente, la existencia de este alelo así como la de HLA-E*0104, que tampoco aparecía en nuestra serie, fue cuestionada (Grimsley et al., 2002) y finalmente retirada del consenso. Por otro lado, parece oportuno mencionar que las frecuencias alélicas HLA-E observadas en nuestra población normal no difieren de las obtenidas en población Danesa (Steffensen et al., 1998), pero si de las de una población de origen Chino procedente de Tailandia, donde HLA-E*01031 fue el alelo predominante con una frecuencia del 39% (Kimkong et al., 2003), mientras que en la población Murciana el alelo predominante fue HLA-E*0101 (69%), seguido por el HLA-E*01032 (61%).

En definitiva, los datos más relevantes sobre la relación entre HLA y melanoma, son los relativos al posible papel ejercido por la presencia del alotipo HLA-C con epítipo Asn80 como posible factor protector frente al desarrollo de melanoma y de su predisposición a metastatizar. También los relacionados con que la presencia de alelos HLA-C con epítipo Lys80 en homocigosis pueda por una parte, constituir un factor que predisponga al desarrollo de melanoma y por otra, al mal pronóstico de la enfermedad, al favorecer la aparición de metástasis linfática temprana (ganglio centinela).

Nuestro siguiente objetivo fue conocer, en un análisis prospectivo, si algunas de las distintas poblaciones de células citotóxicas pueden ser relevantes en la aparición o progresión del melanoma. El análisis fue focalizado sobre las subclases de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) y células NK CD56⁺ que expresan NKRs y

también sobre su relación con los fenotipos HLA-C. Es notorio que las interacciones entre estas moléculas con sus receptores modulan de modo importante la actividad citotóxica de estas células y su funcionalidad como células reguladoras de la respuesta inmunitaria. También, es clásicamente conocido que la respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos es específica de antígeno y restringida por HLA-I mientras que la respuesta citotóxica de las células NK no requiere reconocimiento específico del antígeno y no está restringida por HLA, pero de algún modo gracias a las interacciones KIR/ligando la actividad citotóxica de ambas células también es, al menos en parte dependiente de HLA.

En este estudio prospectivo el número de pacientes analizados fue menor (80 individuos) pero todos fueron caucásicos y compatibles en sexo y edad, de los cuales y entre los pacientes aunque todos fueron diagnosticados histológicamente como afectados de melanoma cutáneo maligno, sus características histopatológicas y estadios clínicos diferían en el momento del diagnóstico.

Como resultado es destacable que entre las células T CD8⁺ de sangre periférica predominara la población que perdía la expresión de CD28 (T CD8⁺CD28⁻) y que expresaba el marcador de activación HLA-DR⁺ en pacientes de melanoma en estadios clínicos no metastáticos (estadios I-II), dato concordante con lo observado en melanoma por otros autores (Casado et al., 2005, Strioga et al., 2011). Realmente, los mecanismos implicados en la diferenciación y/o expansión de la subclase de células TCD8⁺CD28⁻ todavía no han sido bien clarificados, pero se ha descrito que la población T CD8⁺CD28⁻ suele verse incrementada en estados de activación crónica y de la respuesta inmunológica secundaria a infecciones, cáncer, enfermedades autoinmunes y trasplante alogénico. No obstante, es conveniente subrayar que se trata de una población heterogénea, y que puede exhibir tanto funciones citotóxicas como inmunosupresoras y que según se ha descrito que las células de fenotipo T CD8⁺CD28⁻ se inducen cuando se ven sometidas a estímulos antigénicos repetidos y que en este subtipo se pierde capacidad proliferativa y se activa el proceso de senescencia (Tarazona et al., 2000; Arosa, 2002; Brenchley et al., 2003; Tsukishiro et al., 2003; Focosi et al., 2010; Strioga et al., 2011). Hechos que, al menos en parte, podrían explicar la mayor presencia de linfocitos T

CD8⁺CD28⁻ en estadios tempranos de la enfermedad y su decrecimiento en pacientes con metástasis en el ganglio centinela. La abundancia en la población de células T CD8⁺ podrían predecir un pronóstico favorable e indicativo de que *a priori* y al menos en las etapas tempranas de la enfermedad la vigilancia frente al tumor funciona y se manifiesta a través del incremento de la población T activada de fenotipo CD8⁺CD28⁻DR⁺. En este contexto, su decadencia numérica cuando aparece metástasis en el ganglio centinela (estadio III) reflejaría una pérdida de capacidad proliferativa en estas células inducida por estimulación crónica o bien, que su presencia en sangre decaiga al entrar en un estado de senescencia dependiente de este estadio avanzado del tumor (Casado et al., 2005; Strioga et al., 2011). Los hallazgos en relación a esta población de células T, corroboran los de los trabajos publicados previamente por Jovic (2001) quién también informó acerca de la disminución restringida a la subpoblación de células T activadas CD8⁺DR⁺ en pacientes con metástasis y en pacientes en estadio III.

Otra peculiaridad de la población de células T CD8⁺CD28⁻ de nuestros pacientes fue que curiosamente, el número de ellas que expresaban CD161⁺ era el mayor dentro de la población T CD8⁺CD28⁻, dato que confirma lo publicado previamente sobre expresión de CD161 en pacientes de melanoma (Casado et al., 2005). Un hecho que parece característico del melanoma, pues el receptor CD161 generalmente se expresa en la población de células T de memoria CD45RO⁺ con fenotipo CD8⁺CD28⁺ (Werwitzke et al., 2003), lo que le diferencia del resto de NKR que suelen expresarse preferentemente en la población T CD8⁺CD28⁻ y con fenotipo *naive* o CD45RA⁺ (Speiser et al., 1999a; Speiser et al., 1999b; Werwitzke et al., 2003). Este incremento en el número absoluto de células T CD8⁺CD28⁻CD161⁺ en pacientes sin metástasis apunta hacia un desencadenamiento de la actividad citotóxica mediada por las células T CD8⁺CD28⁻ en los estadios tempranos del melanoma, por lo que se puede especular sobre la posibilidad de que la sobreabundancia de esta subpoblación pueda ser una manifestación de los mecanismos de inmunovigilancia desencadenados en el paciente para intentar destruir las células tumorales. Hipótesis, que vendría apoyada por el hecho de que la molécula CD161, también conocida como NKR-P1A (Lanier et al., 1994), haya sido caracterizada como un receptor de activación de la citotoxicidad (Yrlid et al., 1996).

Además, estudios posteriores sobre modelos murinos describieron que el receptor CD161 se asociaba especialmente con la actividad citotóxica ejercida por células T CD8⁺TCRαβ⁺ contra múltiples dianas tumorales, incluyendo células de melanoma (Stremmel et al., 2001). No obstante, hay que tener en cuenta que el receptor NKR-P1A humano puede también contribuir a la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK a través de la interacción con el ligando no HLA, LLT1, más recientemente descrito (Rosen et al., 2005). Sin embargo, hay que recordar que la interacción CD161/LLT1 regula de un modo diferente la función de las células NK y las células T, pues curiosamente, mientras la interacción de esta molécula en células NK inhibe su actividad citotóxica y la producción de IFNγ, en linfocitos T, estimula la producción de IFNγ en respuesta a estímulos a través de CD3 (Aldemir et al., 2005).

Respecto al resto de NKR, particularmente el análisis de los receptores CD57, CD56, CD94 y CD158b, en el total de células T CD8⁺ de sangre periférica de pacientes de nuestra serie no evidencio correlación alguna con la enfermedad. Si bien es cierto que existía una alta variabilidad en el número de células T CD8⁺ circulantes que expresaban los receptores NKR en todos los individuos de nuestra serie y que ello, pudo limitar la obtención de resultados de mayor valor informativo. De todos modos, esta limitación impuesta por la variabilidad en el número de células T NKR⁺ confirma los resultados previos de Speiser (1999b), quien también señalaba la existencia de proporciones variables de células T CD8⁺ efectoras que expresan NKR en los linfocitos circulantes de individuos sanos y pacientes de melanoma. Por el contrario, los datos aquí presentados difieren de los obtenidos en otra serie de pacientes de melanoma españoles, aunque más reducida y clínicamente más heterogénea, en la que describieron un aumento significativo de células T CD8⁺ positivas para los receptores CD57, CD56, o CD158b en melanoma (Casado et al., 2005). Sin embargo, hay que tener en cuenta, que nuestros datos se han expresado en valores absolutos mientras que los del estudio de la otra serie española lo hacía en porcentajes, lo cual, en parte, podría ser causa de las discrepancias entre los dos grupos. Por último, respecto a la diferencia en la cantidad de células T CD8⁺ NKR⁺ en pacientes con metástasis en el ganglio centinela y en pacientes sin metástasis (ver Tabla 20r), debería considerarse la posibilidad de una reducción en la respuesta

inmunitaria mediada por células T CD8⁺ contra el tumor en estadios avanzados de la enfermedad (Casado et al., 2005).

Las células NK en sangre periférica pueden ejercer una acción fundamental en la inmunovigilancia y en la defensa frente a tumores que viene determinada por la integración de señales procedentes de receptores activadores tales como KIR2DS y receptores inhibidores tales como KIR2DL, por eso fueron también evaluadas en nuestra serie de pacientes. En esta parte del estudio, llama la atención que la población NK CD56⁺ era más abundante en pacientes sin metástasis, sugiriendo que la acumulación de estas células ocurre principalmente en los estadios más tempranos de la enfermedad, ya que en los estadios más avanzados la expansión y o acumulación de las mismas, tanto en nuestra serie como en otras series, fue menos relevante (Jovic et al., 2001). Es interesante remarcar que este estudio sobre células NK, ha permitido demostrar por primera vez un aumento de las células NK totales debido especialmente a la acumulación de la subclase de células NK CD56⁺ que expresan los receptores KIR2DL1/S1 también conocidos como moléculas CD158a/h, dado que el número de las células NK CD56⁺ que expresan los receptores KIR2DL2/3/S2 o CD158b/j fue similar en pacientes de melanoma e individuos sanos (ver Tabla 21r).

Estos hallazgos sugieren, tal como ha sido recientemente propuesto en endometriosis, que las células NK CD56⁺ positivas para KIR2DL1/S1 podrían contribuir a la inducción de tolerancia en melanoma ya que potencialmente en las interacciones de este receptor con su ligando predomina la inducción de señales inhibitoras (Matsuoka et al., 2005). Además, también podrían sostener la observación de Guillot et al. en 2005, sobre la ausencia de relación entre el efecto del IFN- α sobre la expresión de perforina por células citotóxicas y la evolución post-terapéutica de la enfermedad, dado que la expresión de los receptores KIR en la superficie de las células NK, podría, al menos parcialmente, bloquear la función anti-tumoral de dichas células efectoras.

En el mismo sentido se puede pensar que el incremento en la intensidad de expresión de receptores KIR2DL1/S1 (CD158a/h) sobre células NK CD56⁺ observado en el estadio III de la enfermedad (ver Figura 3fr), podría intensificar los

mecanismos subyacentes que llevan a la reducida actividad NK que también se ha relacionado previamente con estadios avanzados de la enfermedad (Jovic et al., 2001).

En fin, remarcar que, en concreto, los resultados discutidos en este apartado se ven especialmente reforzados por los siguientes hallazgos observados en el estudio comparativo entre controles y pacientes con melanoma, en este caso, melanoma sin metástasis:

1. El predominio en sangre periférica de células T CD8⁺ y células NK CD56⁺, que expresan los receptores KIR2DL1/S1 (CD158a/h) en pacientes de melanoma, respecto a los controles, sobre todo en los que son homocigotos para HLA-C^{Lys80} (grupo C2 de HLA-C), lo que puede incidir en una alteración del estado de inmunovigilancia en el grupo de pacientes que parecen presentar cierta predisposición a expandir el tumor y a la aparición de metástasis.
2. El aumento en sangre periférica de células NK CD56⁺ que expresan KIR2DL1/S1 (CD158a/h) en pacientes heterocigotos (HLA-C^{Asn80/Lys80}), aunque menos acusado que en los pacientes homocigotos para Lys80 (HLA-C^{Lys80/Lys80}) (ver Figura 4fr), pero mayor que en controles donde en ningún caso se ha observado un aumento significativo en nuestra población sana con esos genotipos.

Estas observaciones cobran especial relieve si se tiene en cuenta que contrariamente a lo que ocurre en pacientes, no se produce expansión de la población T CD8⁺ y ni de la de células NK CD56⁺ en individuos sanos igualmente homocigotos para Lys80 (HLA-C^{Lys80/Lys80}) o en los heterocigotos (HLA-C^{Asn80/Lys80}) de nuestra cohorte ni en las de otros estudios previos (Frohn et al., 1997; Becker et al., 2003).

El probable interés de estos resultados radica en que los alelos HLA-C del grupo C2 (HLA-C^{Lys80}) son ligandos específicos para los receptores KIR2DL1/S1 y, por tanto, estarían propiciando acciones inhibitorias de la inmunovigilancia favoreciendo el escape tumoral. Probablemente, sea este el mecanismo inhibitorio

que prime en pacientes con melanoma de nuestra serie portadores del genotipo homocigoto HLA-C^{Lys80/Lys80}.

Esta interpretación puede ser soportada por el hecho de que el gen que codifica la forma inhibidora KIR2DL1 está presente en prácticamente todos los individuos de nuestra población (Martin et al., 2002; Nikitina-Zake et al., 2004) y porque los correspondientes ligandos C2 pueden ser expresados tanto por las células dendríticas maduras como por las células de melanoma (Martayan et al., 1999; Dellachiesa et al., 2003), favoreciendo de este modo, como ha sido apuntado anteriormente, que las señales inhibitoras mediadas por receptores KIR sean dominantes sobre las activadoras en el grupo de enfermos que padecen melanoma (Vitale et al., 1995; Khakoo et al., 2004; Igarashi et al., 2004; Parham 2004), como ha sido apuntado anteriormente. De acuerdo con esta idea, la expresión de ligandos para estos receptores KIR en las células de melanoma podrían interferir con la efectividad de las células citotóxicas frente al tumor y en consecuencia facilitar su propagación metastásica (Vitale et al., 1995; Mandelboim et al., 1996; Bakker et al., 1998; Nasca et al., 1999; Igarashi et al., 2004; Van Oijen et al., 2004; Mirjačić et al., 2011) y en definitiva, favorecer la tolerancia tumoral y la progresión de la enfermedad. En soporte a esta hipótesis, es bueno recordar la asociación positiva descrita en la primera parte de este trabajo entre los alelos HLA-C^{Lys80} en homocigosis y la presencia de metástasis linfáticas regionales en pacientes con melanoma (Campillo et al., 2006; Campillo et al., 2013).

Simultáneamente, como ya se ha expuesto, en relación a lo que ocurre respecto a los genotipos dependientes de las combinaciones alotípicas HLA-C, se produce también una expansión selectiva de células T CD8⁺ y NK CD56⁺ que expresan los receptores KIR2DL1/S1 en pacientes de melanoma que portan el correspondiente ligando HLA-C^{Lys80} que, en pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, va acompañada de un aumento en la expresión de estos receptores sobre células NK CD56⁺, lo refuerza la probabilidad de que estas células jueguen un particular papel en la regulación de la respuesta inmunitaria que puede tener lugar frente al melanoma.

Todo esto propicia la especulación sobre la posibilidad de abrir nuevas vías terapéuticas para el control de la progresión tumoral en pacientes con melanoma. Precisamente en esta línea, existen ya interesantes resultados previos procedentes de la aplicación de esta estrategia en un modelo murino, demostrativos de que el bloqueo de los receptores inhibidores expresados sobre las células NK aumenta su actividad anti-tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que dichos receptores podrían ser los responsables de la disminución en la respuesta anti-tumoral observada en este modelo (Koh et al., 2001).

En definitiva, todos estos hallazgos señalan al potencial terapéutico antitumoral que ofrecen las acciones dirigidas a la manipulación de las respuestas citotóxicas de los CTL o a desarrollar estrategias capaces de influir en el balance entre las señales de inhibición o activación de las células NK, de tal modo que se pueda impedir o paliar el escape del melanoma a la inmunovigilancia. En este sentido se abre un vasto y atractivo campo para proseguir con la investigación traslacional en ciencias biomédicas cuyo objetivo sea la búsqueda de las terapias eficaces en la lucha antitumoral (Srivastava et al.; 2008)

COCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En este estudio no se ha podido evidenciar una asociación clara de antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A y HLA-B) y los alelos de clase II (HLA-DRB1 y HLA-DQB1) con la susceptibilidad a desarrollar melanoma, su presentación clínica o su evolución
2. Se ha podido observar, por primera vez, que la presencia del alelo HLA-C*07 o más aun la del alotipo HLA-C^{Asn80} resulta protectora frente a la susceptibilidad al melanoma y frente a la aparición de metástasis en el ganglio centinela.
3. También se ha visto por primera vez, que la presencia de alelos HLA-C portadores de Lys80 en homocigosis aumenta la susceptibilidad al melanoma y favorece la aparición de metástasis linfática temprana (ganglio centinela), por lo que puede considerarse como un factor de mal pronóstico.
4. Las variantes alélicas codificadas por el locus HLA-E no se asocian positiva o negativamente a la aparición de melanoma cutáneo.
5. En pacientes con melanoma en estadios no metastáticos, se ha podido comprobar la existencia de un aumento de linfocitos activados T CD8⁺ CD28⁻ DR⁺ y T CD8⁺CD28⁻CD161⁺ circulantes que, puede ser un reflejo de una estimulación de la respuesta inmunitaria frente al tumor en estadios tempranos de la enfermedad.
6. Se ha detectado, también por primera vez, la existencia de una expansión de linfocitos T CD8⁺ KIR2DL1/S1 en pacientes de melanoma que portan el ligando HLA-C^{Lys80} y además, de células NK CD56⁺ KIR2DL1/S1 en todos los genotipos aunque más acentuada en los homocigotos para Lys80, que sugiere un papel de estas células en regulación de la respuesta antitumoral.
7. En conjunto todos estos hallazgos pueden ser aprovechados para explorar el posible potencial terapéutico antitumoral que pueden ofrecer las acciones dirigidas a controlar el balance de la respuesta citotóxica de linfocitos T efectores y de células NK y como base de estrategias dirigidas al diseño de nuevos fármacos inmunomoduladores.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970; 172 (5): 902–908
2. Abbott JJ, Amirkhan RH, Hoang MP: Malignant melanoma with a rhabdoid phenotype: histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of a case and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128: 686-688
3. Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol.* 1981; 127 (3): 1024-9.
4. Agrawal S, Tripathi P, Naik S. Roles and mechanism of natural killer cells in clinical and experimental transplantation. *Expert Rev Clin Immunol.* 2008; 4 (1): 79-91.
5. Al Omar S, Middleton D, Marshall E, Porter D, Xinarianos G, Raji O, Field JK, Christmas SE. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors. *Hum Immunol.* 2010; 71: 976-981
6. Al Omar SY, Marshall E, Middleton D, Christmas SE. 2011. Increased killer immunoglobulin-like receptor expression and functional defects in natural killer cells in lung cancer. *Immunology* 133: 94 – 104.
7. Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, Bihl F, Braud VM. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol.* 2005; 175 (12): 7791-5.
8. Alegre de Miquel. V. *Dermatologia.* <http://www.uv.es/derma/CLindex/CLmelanoma/CLmelanoma.htm>
9. Althuis MD, Scoccia B, Lamb EJ, Moghissi KS, Westhoff CL, Mabie JE, Brinton LA. Melanoma, thyroid, cervical, and colon cancer risk after use

- of fertility drugs. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193 (3 Pt 1): 668-74.
10. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005; 24 (50): 7455-64
 11. Álvarez-Mon M, Camacho F, Diaz-Perez E, Díaz-Rubio JL, González-Larriba JL, Guillem V, López JJ, Moreno JA, Serrano S y Toribio J. *Melanoma*. Ed. Just in Time S. L. 2005. Madrid.
 12. Álvarez Díaz A, Hilario Rodríguez E. Desarrollo y transformación tumoral de los melanocitos. *Revisiones en Biología celular y molecular*. Editado por Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao, 2010: 234-254.
 13. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006; 25 (2): 331-42.
 14. Arosa FA. CD8+CD28-T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol Cell Biol.* 2002; 80: 1-13
 15. Bakker AB, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol.* 1998; 160 (11): 5239-45.
 16. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19 (16): 3635–48 (b)
 17. 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; 27: 6199–6206
18. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 3622–3634 (a)
 19. Barber JI, Townsend D, Olds DP, King RA. Decreased dopachrome oxidoreductase activity in yellow mice. *J Hered*. 1985; 76: 59-60
 20. Barger BO, Acton RT, Soong SJ, Roseman J, Balch C. Increase of HLA-DR4 in melanoma patients from Alabama. *Cancer Res*. 1982; 42 (10): 4276-9.
 21. Bateman AC, Turner SJ, Theaker JM, Howell WM. HLA-DQB1*0303 and *0301 alleles influence susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma in the British Caucasian population. *Tissue Antigens* 1998; 52: 67-73.
 22. Batliwalla FM, Bateman BA, Serrano D, Murray D, Macphail S, Maino VC, Ansel JC, Gregersen PK, Armstrong CA. A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire. *Mol Med*. 1998; 4 (12): 783-94.
 23. Becker JC, Guldborg P, Zeuthen J, Bröcker EB, Straten PT. Accumulation of identical T cells in melanoma and vitiligo-like leukoderma. *J Invest Dermatol*. 1999; 113 (6): 1033-8.
 24. Becker S, Tonn T, Fussel T, Uhrberg M, Bogdanow M, Seifried E, Seidl C. Assessment of killer cell immunoglobulinlike receptor expression and corresponding HLA class I phenotypes demonstrates heterogenous KIR expression independent of anticipated HLA class I ligands. *Hum*

- Immunol. 2003; 64: 183-93
25. Bernal-Perez M. Epidemiología del melanoma. 2005. <http://sameens.dia.uned.es/Trabajos2/T1A/BernalPerezM/1%20Trabajo>.
 26. Biassoni R, Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C, Sivori S, et al. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50. 1 and p58. 1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol.* 1997; 27 (12): 3095-9.
 27. Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, Flint J, Willberg CB, Bengsch B, Seigel B, Ramamurthy N, Zitzmann N, Barnes EJ, Thevanayagam J, Bhagwanani A, Leslie A, Oo YH, Kollnberger S, Bowness P, Drognitz O, Adams DH, Blum HE, Thimme R, Klenerman P. Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107 (7): 3006-11.
 28. Björkström NK, Ljunggren HG, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol.* 2010; 31 (11): 401-6. Imagen nk
 29. Blais ME, Dong T, Rowland-Jones S. HLA-C as a mediator of natural killer and T-cell activation: spectator or key player? *Immunology*, 2011; 133: 1-7.
 30. Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, Solana R, Coligan JE. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol.* 2002; 38 (9): 637-60.
 31. Borrego F, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. Nk cell CD94/NKG2a inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. *J Immunol.* 2002; 169: 6102-6111
 32. Borrego F, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of

- inhibitory signaling processes. *J Immunol.* 2002; 169: 6102-11
33. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (hla)-e complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med.* 1998; 187: 813-818
 34. Box NF, Wyeth JR, O’Gorman LE, et al. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet.* 1997; 6 (11): 1891-7
 35. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149 (1): 1-8.
 36. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 21: 77-82.
 37. Boyum A. Separating of blood leukocytes, granulocytes & lymphocytes. *Tissue Antigens* 1974; 4: 269-277.
 38. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood.* 2003; 101 (7): 2711-20.
 39. Breslow A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1975; 182 (5): 572–575.
 40. Brümmendorf T, Lemmon V: Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13: 611–618
 41. Bullock TN, Mullins DW, Colella TA, Engelhard VH. Manipulation of avidity to improve effectiveness of adoptively transferred CD8 (+) T cells for melanoma immunotherapy in human MHC class I-transgenic mice. *J Immunol.* 2001; 167 (10): 5824-31.

42. Burshtyn DN, Lam AS, Weston M, Gupta N, Warmerdam PA, Long EO. Conserved residues amino-terminal of cytoplasmic tyrosines contribute to the SHP-1-mediated inhibitory function of killer cell Ig-like receptors. *J Immunol.* 1999; 162 (2): 897-902.
43. Cabrera T, Lara E, Romero JM, Maleno I, Real LM, Ruiz-Cabello F, Valero P, Camacho FM, Garrido F. HLA class I expression in metastatic melanoma correlates with tumor development during autologous vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56 (5): 709-17.
44. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008; 112 (3): 461-9.
45. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today.* 1993; 14 (7): 349-52.
46. Campillo JA, Legaz I, Lopez-Alvarez MR, Bolarin JM, Las Heras B, Muro M, et al. KIR gene variability in cutaneous malignant melanoma: influence of KIR2D/HLA-C pairings on disease susceptibility and prognosis. *Immunogenetics.* 2013; 65 (5): 333-43.
47. Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Moya-Quiles MR, Marín LA, Muro M, Guerra N, Parrado A, Campos M, Frías JF, Minguela A, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. Natural killer receptors on CD8 T cells and natural killer cells from different HLA-C phenotypes in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (16): 4822-4831.
48. Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Muro M, Moya-Quiles R, Marín LA, Montes-Ares O, Guerra N, Sánchez-Pedreño P, Frías JF, Lozano JA, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. HLA class I and class II frequency in patients with cutaneous malignant melanoma from South-Eastern Spain: The role of HLA-C in disease prognosis. *Immunogenetics* 2006, 57 (12): 926-933
49. Cardesa Salzmán T, Grau Carod M, Fontenla García J. R. Unidad de Oftalmología. Universidad de Barcelona. 2012.
<http://www.ub.edu/oftalmo/clases/lec15/melano.htm>

50. Carrega P, Pezzino G, Queirolo P, Bonaccorsi I, Falco M, Vita G, Pende D, Misefari A, Moretta A, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *PLoS One*. 2009; 4 (12): e8132.
51. Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho FM, Real LM, Garrido F, Cabrera T. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics*. 2008; 60 (8): 39-47
52. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005; 201 (7): 1069-75.
53. Casado JG, Soto R, DelaRosa O, Peralbo E, del Carmen Munoz-Villanueva M, Rioja L, Pena J, Solana R, Tarazona R. CD8 T cells expressing NK associated receptors are increased in melanoma patients and display an effector phenotype. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54: 1162-71
54. Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. Antitumor immunity and cellular cancer therapies. *Med Sci (Paris)*. 2003; 19 (1): 43-53.
55. Cavelier B, Daveau M, Gilbert D, Fontaine M, Cesarini JP, Delpech B. Augmentation of HL-A A9 antigen in malignant melanoma, principally in metastatic or recurrent forms. Apropos of 105 cases of melanoma of which 34 were serious form. *C R Seances Acad Sci D* 1980; 291: 241-3.
56. Chang CC, Campoli M, Restifo NP, Wang X, Ferrone S. Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J Immunol*. 2005; 174 (3): 1462-71.

57. Chang CC, Ferrone S. HLA-G in melanoma: can the current controversies be solved? *Semin Cancer Biol.* 2003; 13: 361-9.
58. Chang NB, Feng R, Gao Z, Gao W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. *Int J Hyg Environ Health.* 2010; 213 (5): 359-68.
59. Characiejus, D. , Pasukoniene, V. , Jonusauskaite, R. , Azlauskaite, N. , Aleknavicius, E. , Mauricas, M. , Otter, W. Peripheral blood CD8highCD57 lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alfa. *Anticancer Res.* 2008; 28: 1139-1142.
60. Chertkoff LP, Herrera M, Mota AH, Palavecino E, Fainboim L, Satz ML. DNA polymorphism of the hla-b35 gene associated to different hla-c locus alleles. *Hum Immunol.* 1988; 23: 241-253
61. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest.* 2005; 115 (4): 813
62. Ciccone E, Pende D, Viale O, Than A, Di Donato C, Orengo AM, Biassoni R, Verdiani S, Amoroso A, Moretta A, et al. 1992. Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2) . *J Exp Med* 176: 963-71
63. Clark WH, Jr. , Elder DE, Guerry Dt, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81: 1893–1904.
64. Clark WH, Jr. , From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969; 29: 705-27
65. Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R.

- Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (9): 659-70.
66. Collins EJ, Frelinger JA. Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/peptide complexes. *Immunol Rev.* 1998; 163: 151-60.
67. Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1-and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 12000-4.
68. Colvin RB. Cellular and molecular mechanisms of allograft rejection. *Annu Rev Med.* 1990; 41: 361-75.
69. Cooley S, Xiao F, Pitt M, Gleason M, McCullar V, Bergemann TL, McQueen KL, Guethlein LA, Parham P, Miller JS. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood.* 2007; 110 (2): 578-86.
70. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22 (11): 633-40. (a)
71. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. 2001; *Blood* 97: 3146-51(b)
72. Cramer SF. The melanocytic differentiation pathway in congenital melanocytic nevi: theoretical considerations. *Pediatr Pathol.* 1988; 8: 253-65.
73. Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. 2003; *Eur J Immunol* 33: 1657-66.
74. DeSandro A, Nagarajan UM, Boss JM. The bare lymphocyte

- syndrome: molecular clues to the transcriptional regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 279-86.
75. Doré JF, Chignol MC. Tanning salons and skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 2012; 11 (1): 30-7.
76. Dunham I, Sargent CA, Dawkins RL, Campbell RD. An analysis of variation in the long-range genomic organization of the human major histocompatibility complex class II region by pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics.* 1989, (4): 787-96.
77. Dupin E. , N. M. Le Douarin. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene.* 2003; 22: 3016-3023.
78. Edelman GM, Jones FS: Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 1998, 26: 337–352
79. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Jr. , Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, Wolfe RA, Goodrich NP, Bayakly AR, Clarke CA, Copeland G, Finch JL, Fleissner ML, Goodman MT, Kahn A, Koch L, Lynch CF, Madeleine MM, Pawlish K, Rao C, Williams MA, Castenson D, Curry M, Parsons R, Fant G, Lin M. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA.* 2011. 306: 1891-901
80. Epstein JH. Photocarcinogenesis: a review. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1978; (50): 13-25.
81. Fan QR, Long EO, Wiley DC. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol.* 2001; 2: 452-60
82. Farag, S. S. and M. A. Caligiuri. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006; 20 (3): 123-137.
83. Feltkamp TE, Khan MA, Lopez de Castro JA. The pathogenetic role of HLA-B27. *Immunol Today.* 1996; 17: 5-7.

84. Fitzpatrick TB, Szabó G, Seiji M, and Quevedo WC. Biology of the melanin-pigmentary system. *Dermatology in General Medicine*, 2nd ed. (TB Fitzpatrick, AZ Eisen, K Wolff, IM Freedberg and KF Austen, Eds.) McGraw-Hill, New York. 1979. Pag.:131-163.
85. Fitzpatrick TB, Bologna JL. Human melanin pigmentation: Role in pathogenesis of cutaneous melanoma. In: Zeise L, Chedekel MR, Fitzpatrick TB, ed. *Melanin: Its role in human photoprotection*. Overland Park, KS, Valdenmar Ed. , 1995, pag.: 239–244.
86. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988; 124: 869-71.
87. Flaherty KT. BRAF inhibitors and melanoma. *Cancer J*. 2011 Nov -; 17 (6): 505-1
88. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol*. 2010; 87 (1): 107-16.
89. Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? *Am J Dermatopathol*. 2003; 25 (5): 371-6.
90. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006; 214: 56-72
91. Friedmann PS, Wren F, Buffey J, Macneil S. Alpha-MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. *Br J Dermatol*. 1990. 123: 145-151.
92. Frohn C, Schlenke P, Kirchner H. The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology*. 1997; 92 (4): 567-70.
93. Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM, Mordoh J, Rabinovich GA, Zwirner NW Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated

- cytotoxicity. *J Immunol.* 2008, 180 (7): 4606-14.
94. Furukawa H, Yabe T, Akaza T, et al. Cell surface expression of HLA-E molecules on PBMC from a TAP1-deficient patient. *Tissue Antigens.* 1999; 53: 292-5.
95. Gandini S, Autier P, Boniol M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 107(3): 362-6.
96. Garibyan, L. and D. E. Fisher, How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep,* 2010; 12 (5): p. 319-26.
97. Gattenlöhner S, Stühmer T, Leich E, Reinhard M, Etschmann B, Völker HU, Rosenwald A, Serfling E, Bargou RC, Ertl G, Einsele H, Müller-Hermelink HK. Specific detection of CD56 (NCAM) isoforms for the identification of aggressive malignant neoplasms with progressive development. *Am J Pathol.* 2009; 174 (4): 1160-71.
98. Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Graef T, Moesta AK, Layrisse Z, Parham P. Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (44): 18692-7.
99. Germain C, Meier A, Jensen T, Knapnougel P, Poupon G, Lazzari A, Neisig A, Håkansson K, Dong T, Wagtmann N, Galsgaard ED, Spee P, Braud VM. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *J Biol Chem.* 2011; 4; 286 (44): 37964-75.
100. Ghiorzo P, Scarra GB. 2003. Genetics of melanoma susceptibility. *Forum (Genova)* 13: 114-22; quiz 87
101. Gimotty PA, Botbyl J, Soong SJ, Guerry D. A population-based validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (31): 8065-75.
102. Goldstein, A. M. and M. A. Tucker, A piece of the melanoma puzzle. *J Natl Cancer Inst,* 2005; 97 (20): 1486-7.

103. Gomez-Lozano N, de Pablo R, Puente S, Vilches C. Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction. *Eur J Immunol* 2003; 33: 639-44.
104. Gonzalez-Campora R, Galera-Davidson H, Vazquez-Ramirez FJ, Diaz-Cano S. Blue nevus: classical types and new related entities. A differential diagnostic review. *Pathol Res Pract*. 1994; 190: 627-35
105. Grimsley C, Kawasaki A, Gassner C, Sageshima N, Nose Y, Hatake K, Geraghty DE, Ishitani A. Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data. *Tissue Antigens*. 2002; 60: 206-12
106. Guillot B, Portales P, Thanh AD, Merlet S, Dereure O, Clot J, Corbeau P. The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment. *Br J Dermatol*. 2005; 152: 690-6
107. Harris ML, Erickson CA. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev. Dyn*. 2007. 236: 1-19.
108. Heinzl S, Rea D, Offringa R, Pawelec G. The self peptide annexin II (208-223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2001; 49 (12): 671-8.
109. Held W, Coudert JD, Zimmer J. The NK cell receptor repertoire: formation, adaptation and exploitation. *Curr Opin Immunol*. 2003; 15(2): 233-7.
110. Held W, Kijima M, Angelov G, Bessoles S. The function of natural killer cells: education, reminders and some good memories. *Curr Opin Immunol*. 2011; 23 (2): 228-33.
111. Herberman, R. B. Natural killer cells. *Annual Review Medicine*. 1986; 37: 437-452.
112. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M,

- Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 2004; 200: 957-65
113. Hill AV, Elvin J, Willis AC, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* 1992; 360: 434-9.
114. Hill AV, Jepson A, Plebanski M, Gilbert SC. Genetic analysis of host-parasite coevolution in human malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997; 352: 1317-25.
115. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanchez FO. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2005; 125 (4): 721-30.
116. Hu S, Ma F, Collado-Mesa F, Kirsner RS. UV radiation, latitude, and melanoma in US Hispanics and blacks. *Arch Dermatol.* 2004; 140 (7): 819-24.
117. Huarte E, Cubillos-Ruiz JR, Nesbeth YC, Scarlett UK, Martinez DG, Engle XA, et al. PILAR is a novel modulator of human T-cell expansion. *Blood.* 2008; 112 (4): 1259-68.
118. Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP Jr, Takahashi Y, Suffredini DA, Linehan WM, Caligiuri MA, Childs RW. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood.* 2004; 104 (1): 170-7.
119. Jiang C, Ye D, Qiu W, Zhang X, Zhang Z, He D, Zhang P, Chen W. Response of lymphocyte subsets and cytokines to Shenyang prescription in Sprague-Dawley rats with tongue squamous cell carcinomas induced by 4NQO. *BMC Cancer.* 2007; 7: 40-49.
120. Johnson JP: Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 18: 345–357
121. Jović V, Konjević G, Radulović S, Jelić S, Spuzić I. Impaired-dependent

- NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma. *Tumori*. 2001; 87 (5): b324-9.
122. Kadonaga JN, Frieden IJ. Neurocutaneous melanosis: definition and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1991; 24: 747-55.
123. Kageshita T, Naruse T, Hirai S, et al. Molecular genetic analysis of HLA class II alleles in Japanese patients with melanoma. *Tissue Antigens*. 1997; 49: 466-70.
124. Kageshita T, Naruse T, Hirai S, Horikoshi T, Nakagawa H, Tamaki K, Hayashibe K, Ichihashi M, Nakayama J, Hori Y, Ozawa A, Miyahara M, Ohkido M, Inoko H, Ono T. HLA class I antigens in Japanese patients with melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1996; 19 (6): 428-32.
125. Kannengiesser C, Dalle S, Leccia MT, Avril MF, Bonadona V, Chompret A, Lasset C, Leroux D, Thomas L, Lesueur F, Lenoir G, Sarasin A, Bressac-de Paillerets B. New founder germline mutations of CDKN2A in melanoma-prone families and multiple primary melanoma development in a patient receiving levodopa treatment. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007; 46 (8): 751-60.
126. Kelly A, Powis SH, Glynne R, Radley E, Beck S, Trowsdale J. Second proteasome-related gene in the human mhc class ii region. *Nature*. 1991; 353: 667-668
127. Kenneth HK; Myung-Moo L; Alan DA; W. Clark L. The Role of Sunlight and DNA Repair in Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer. The Xeroderma Pigmentosum Paradigm. *Arch Dermatol*. 1994; 130 (8): 1018-1021.
128. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving

- hepatitis C virus infection. *Science*. 2004; 305 (5685): 872-4.
129. Kim CJ, Reintgen DS, Balch CM; AJCC Melanoma Staging Committee. The new melanoma staging system. *Cancer Control*. 2002; 9 (1): 9-15.
130. Kimkong I, Mutirangura A, Pimtanothai N. Distribution of human leukocyte antigens-E alleles in Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2003; 86 Suppl 2: S230-6
131. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343: 702-9. (a)
132. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000, 343: 782-6. (b)
133. Kmetz EC, Sanders H, Fisher G, Lang PG, Maize JC Sr. The role of observation in the management of atypical nevi. *South Med J*. 2009; 102 (1): 45-8.
134. Kraemer KH, Greene MH, Tarone R, Elder DE, Clark WH, Jr. , Guerry Dt. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet*. 1983; 2: 1076-7
135. Kumanovics A, Takada T, Lindahl KF. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 629-57.
136. Landi, M. T. , et al. , DNA repair, dysplastic nevi, and sunlight sensitivity in the development of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 2002; 94 (2): p. 94-101.
137. Langard S, Rosenberg J, Andersen A, Heldaas SS. Incidence of cancer among workers exposed to vinyl chloride in polyvinyl chloride manufacture. *Occup Environ Med*. 2000; 57 (1): 65-8.
138. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56) . *J Immunol*. 1991; 146 (12): 4421-6.

139. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*. 1998; 8 (6): 693-701.
140. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986; 136: 4480-4486. (a)
141. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar, V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol*. 1986; 137: 2735-2739 (b)
142. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989; 169: 2233-2238.
143. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2003; 15 (3): 308-14
144. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 225-74.
145. Lanier, LL., Chang C., Phillips JH., Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol*, 1994; 153 (6): 2417- 28.
146. Laud K, Marian C, Avril MF, Barrois M, Chompret A, Goldstein AM, Tucker MA, Clark PA, Peters G, Chaudru V, Demenais F, Spatz A, Smith MW, Lenoir GM, Bressac-de Paillerets B. Comprehensive analysis of CDKN2A (p16INK4A/p14ARF) and CDKN2B genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma. *J Med Genet*, 2006. 43 (1): 39-47.
147. Le Mire L, Hollowood K, Gray D, Bordea C, Wojnarowska F. Melanomas in renal transplant recipients. *Br J Dermatol*. 2006; 154 (3): 472-7.
148. Lee JE, Abdalla J, Porter GA, Bradford L, Grimm EA, Reveille JD,

- Mansfield PF, Gershenwald JE, Ross MI. Presence of the human leukocyte antigen class II gene DRB1*1101 predicts interferon gamma levels and disease recurrence in melanoma patients. *Ann Surg Oncol.* 2002; 9: 587-93.
149. Lee JE, Reveille JD, Ross MI, Platsoucas CD. HLA-DQB1*0301 association with increased cutaneous melanoma risk. *Int J Cancer.* 1994; 59 (4): 510-3.
150. Lee JH, Essner R, Torisu-Itakura H, Wanek L, Wang H, Morton DL. Factors predictive of tumor-positive nonsentinel lymph nodes after tumor-positive sentinel lymph node dissection for melanoma. *J Clin Oncol.* 2004; 15; 22 (18): 3677-84.
151. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 1998a; 160: 4951-60 (a) .
152. Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5199-204 (b).
153. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med.* 1999; 5 (6): 677-685.
154. Lefranc MP, Duprat E, Kaas Q, Tranne M, Thiriot A, Lefranc G. IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. *Dev Comp Immunol.* 2005; 29 (11): 917-38.
155. Leong SP, Kashani-Sabet M, Desmond RA, Kim RP, Nguyen DH, Iwanaga K, Treseler PA, Allen RE Jr, Morita ET, Zhang Y, Sagebiel RW, Soong SJ. Clinical significance of occult metastatic melanoma in sentinel lymph nodes and other high-risk factors based on long-term follow-up.

- World J Surg. 2005; 29 (6): 683-91.
156. Li G, Yu M, Weyand CM, Goronzy JJ. Epigenetic regulation of killer immunoglobulin-like receptor expression in T cells. *Blood*. 2009, 15; 114 (16): 3422-30.
157. Li Y, McGowan P, Hellstrom I, Hellstrom KE, Chen L. Costimulation of tumor-reactive CD4+ and CD8+ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28, can be used to treat established mouse melanoma. *J Immunol*. 1994; 153 (1): 421-8.
158. Lim DG, Slavik JM, Bourcier K, Smith KJ, Hafler DA. Allelic variation of MHC structure alters peptide ligands to induce atypical partial agonistic CD8+ T cell function. *J Exp Med* 2003; 198: 99-109.
159. Lin A, Zhang X, Ruan YY, Wang Q, Zhou WJ, Yan WH. HLA-F expression is a prognostic factor in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011; 74 (3): 504-9.
160. Liu K, Rosenberg SA. Transduction of an IL-2 Gene into Human Melanoma-Reactive Lymphocytes Results in Their Continued Growth in the Absence of Exogenous IL-2 and Maintenance of Specific Antitumor Activity. *The Journal of Immunology*, 2001;167: 6356-6365.
161. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990; 11: 237-244
162. Lombardi ML, Mercurio O, Pirozzi G, Ionna F, Lombardi V, Mozzillo N, Manzo C. . Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 polymorphism in Italian melanoma patients. *J Immunother* 1998; 21: 435-9.
163. Long EO, Barber DF, Burshtyn DN, et al. Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev*. 2001; 181: 223-233.
164. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17: 875-904.

165. Long EO. Signal sequences stop killer cells. *Nature*. 1998; 391 (6669): 740-1, 3.
166. Long, EO. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12 (1): 57-61.
167. López-Botet, M; Moretta, L; Strominger, J. NK-cell receptor and recognition of MHC class I molecules. *Immunology today*. 1996; 17 (5): 212-214.
168. Lulli P, Grammatico P, Brioli G, Catricalà C, Morellini M, Roccella M, Mariani B, Pennesi G, Roccella F, Cappellacci S, Trabace S. HLA-DR and-DQ alleles in Italian patients with melanoma. *Tissue Antigens*. 1998; 51 (3): 276-80.
169. Luongo V, Pirozzi G, Caraco C, Errico S, de Angelis F, Celentano E, Paino F, Chiofalo MG, Luongo M, Mozzillo N, Lombardi ML. HLA allele frequency and clinical outcome in Italian patients with cutaneous melanoma. *Tissue Antigens*. 2004; 64: 84-7
170. Maddodi N, Setaluri V. Role of UV in cutaneous melanoma. *Photochem Photobiol*. 2008; 84 (2): 528-36.
171. Maier S, Grzeschik M, Weiss EH, Ulbrecht M. Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Hum Immunol*. 2000; 61: 1059-65.
172. Malarkannan S. The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions. *Semin Immunol*. 2006; 18 (3): 186-92.
173. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 1878-90.
174. Mancini AJ. *Skin. Pediatrics*. 2004; 113 (4 Suppl): 1114-9.
175. Mandelboim O, Reyburn HT, Vales-Gomez M, et al. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also

- occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med.* 1996; 184: 913-22.
176. Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, et al. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics.* 2003; 54: 767-75.
177. Marincola FM, Venzon D, White D, Rubin JT, Lotze MT, Simonis TB, Balkissoon J, Rosenberg SA, Parkinson DR. HLA association with response and toxicity in melanoma patients treated with interleukin 2-based immunotherapy. *Cancer Res.* 1992; 52: 6561-6
178. Marsh SG; WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update. *Hum Immunol.* 2012; 73 (1): 130-4
179. Martayan A, Fraioli R, Giorda E, Setini A, Ciccarelli G, Delfino L, Ferrara GB, Giacomini P. Biosynthesis of HLA-C heavy chains in melanoma cells with multiple defects in the expression of HLA-A,-B,-C molecules. *Br J Cancer.* 1999; 80 (5-6): 639-49.
180. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D, Carrington M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol.* 2002; 169: 2818-22
181. Martínez-Clambor P. Ajuste del valor-p por contrastes múltiples. *Revista Chilena de Salud Pública,* 2012; 16 (3): 225-232
182. Martínez-Escribano JA, Campillo JA, Piñero A, Frías JF, Sánchez-Pedreño P, Corbalan R, Minguela A, Álvarez-López MR. Estudio prospectivo de los niveles e citocinas séricas en pacientes con melanoma: valor pronóstico. *Actas Dermosifiliogr.* 2005; 96 (2): 83-91.
183. Martínez Escribano JA, Piñero Madrona A, Torre Minguela C, Ródenas López JM. Melanoma Cutáneo. Guía Clínica Práctica. Ed. Consejería de Sanidad y Política Social. Servicio Murciano de Salud. Murcia, 2012: <https://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/2315>

51-MELANOMA_WEB. pdf

184. Martínez Naves E, Parra Cuadrado JF, Pérez Rosado A, Gómez Del Moral M. Structure and function of "non-classical" HLA class I molecules. *Inmunologia*, 2001; 20 (4): 207-215;
185. Mathew PA, Chuang SS, Vaidya SV, Kumaresan PR, Boles KS, Pham HT. The LLT1 receptor induces IFN-gamma production by human natural killer cells. *Mol Immunol*. 2004; 40 (16): 1157-63.
186. Matsunami K, Miyagawa S, Nakai R, Yamada M, Shirakura R. Modulation of the leader peptide sequence of the HLA-E gene up-regulates its expression and down-regulates natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation*. 2002; 73 (10): 1582-9.
187. Matsuoka S, Maeda N, Izumiya C, Yamashita C, Nishimori Y, Fukaya T. Expression of inhibitory-tumor killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women with pelvic endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 53: 249-54
188. McQueen KL, Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14 (5): 615-21.
189. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, et al. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1507-15.
190. Merino J, Martínez-González MA, Rubio M, Inogés S, Sánchez-Ibarrola A, Subira ML. Progressive decrease of CD8^{high}+ CD28+ CD57) cells with ageing. *Clin Exp Immunol*. 1998; 112: 48-51.
191. Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*. 1996; 74 (1): 43-7.
192. Miller JS, McCullar V. Human natural killer cells with polyclonal lectin

- and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood*. 2001; 98 (3): 705-13.
193. Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol Today*. 1998; 19 (4): 153-7 (a) .
194. Mingari MC, Ponte M, Bertone S, Schiavetti F, Vitale C, Bellomo R, et al. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen-or alloantigen-activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (3): 1172-7 (b) .
195. Mingari MC, Ponte M, Cantoni C, Vitale C, Schiavetti F, Bertone S, Bellomo R, Cappai AT, Biassoni R. HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells. *Int Immunol*. 1997; 9 (4): 485-91.
196. Mingari MC, Vitale C, Schiavetti F, Cambiaggi A, Bertone S, Zunino A, et al. HLA-class I-specific inhibitory receptors of NK type on a subset of human T cells. *Chem Immunol*. 1996; 64: 135-45.
197. Mirjačić Martinović K1, Konjević G, Babović N, Inić M. The stage dependent changes in NK cell activity and the expression of activating and inhibitory NK cell receptors in melanoma patients. *J Surg Res*. 2011; 171(2): 637-49.
198. Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology*. 2007; 121 (4): 439-47.
199. Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A. Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624: 104-16.
200. Moesta AK, Abi-Rached L, Norman PJ, Parham P. 2009. Chimpanzees use more varied receptors and ligands than humans for inhibitory killer

- cell Ig-like receptor recognition of the MHC-C1 and MHC-C2 epitopes. *J Immunol.* 182: 3628-37
201. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol.* 2008; 180 (6): 3969-79.
202. Moller P, Hammerling GJ. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumour immunity. *Cancer Surv* 1992; 13: 101-27.
203. Monaco JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 17-20.
204. Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, et al. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med.* 1990; 172 (6): 1589-98.
205. Moretta A, Bottino C, Tripodi G, Vitale M, Pende D, Morelli L, et al. Novel surface molecules involved in human NK cell activation and triggering of the lytic machinery. *Int J Cancer Suppl.* 1992; 7: 6-10.
206. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 619-48.
207. Moretta A, Moretta L. HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9 (5): 694-701.
208. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med.* 1995; 182: 875-84
209. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human

- natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol.* 1994; 55: 341-80
210. Moretta L., Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors *Curr Opin Immunol.* 2004; 16: 626-633.
211. Morita I, Kakuda S, Takeuchi Y, Kawasaki T, Oka S. HNK-1 (human natural killer-1) glyco-epitope is essential for normal spine morphogenesis in developing hippocampal neurons. *Neuroscience.* 2009; 164 (4): 1685-94.
212. Morley, J. , Batliwalla, F. , Hingorani, R. , Gregersen, P. Oligoclonal CD8+ T cells are preferentially expanded in the CD57+ subset. *J. Immunol.* 1995; 154: 6182–6190.
213. Moya-Quiles MR, Martínez-Escribano J, Guerra-Pérez N, Muro M, Marín L, Campillo JA, Montes-Ares O, Frías J, Minguela A, García-Alonso AM, Lozano JA, Álvarez-López MR. Lack of association of between HLA-E polymorphism and primary cutaneous melanoma in Spanish patients. *J Dermatol Sci.* 2005, 40 (1): 62-64
214. Moyano Jato, AJ. Un poco de Historia. UN POCO DE HISTORIA. <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=content-disposition&blobheadervalue1=filename%3Dhistoria.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DHospitalRamonCajal&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1202784790213&ssbinary=true>
215. Mueller-Eckhardt G, Schendel DJ, Hundeiker M, Riedel T, O'Neill GJ, Riethmüller G, Mueller-Eckhardt C. Possible association between HLA-DR5 and superficial spreading melanoma (SSM) . *Int J Cancer.* 1984; 15; 34 (6): 751-5.
216. Muto M, Ohmura A, Nakano J, Yamazaki N, Yamamoto A, Ishihara K, Sasazuki T, Asagami C. HLA class I polymorphism and the susceptibility to malignant melanoma. *Tissue Antigens.* 1996; 47: 447-9.

217. Nagore E, Planelles MD, Ledesma E, Millán JM, Insa A, Oliver V, Guillén C, ForteaJM. Molecular genetic analysis of HLA-DR and-DQ alleles in Spanish patients with melanoma. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82: 90-3.
218. Nasca R, Carbone E. Natural killer cells as potential tools in melanoma metastatic spread control. *Oncol Res.* 1999; 11 (8): 339-43.
219. Natarajan, K. , Dimasi, N. , Wang, J. , Mariuzza, R. A. , Margulies, D. H. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 853–885.
220. Naumova E, Mihaylova A, Ivanova M, Mihailova S. Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56: 95-100.
221. Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, Ivanova M, Quin L, Toneva M. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 172-8
222. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol.* 2004; 173 (7): 4273-6.
223. Nickoloff, B. J. , et al. , Response of murine and normal human skin to injection of allogeneic blood-derived psoriatic immunocytes: detection of T cells expressing receptors typically present on natural killer cells, including CD94, CD158, and CD161. *Arch Dermatol,* 1999. 135 (5): p. 546-52.
224. Nikitina-Zake L, Rajalingham R, Rumba I, Sanjeevi CB. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Latvian patients with type 1 diabetes mellitus and healthy controls. *Ann N Y Acad Sci.*

2004; 1037: 161-9

225. Nishino S, Okura M, Mignot E. Narcolepsy: genetic predisposition and neuropharmacological mechanisms. REVIEW ARTICLE. *Sleep Med Rev.* 2000; 4: 57-99.
226. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun.* 2009; 9: 3.
227. O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 1998; 163: 129-38.
228. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, Hiraide H, Sekine I. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. *Immunology.* 2001; 103 (3): 281-90.
229. Oijen M, Bins A, Elias S, Sein J, Weder P, de Gast G, Mallo H, Gallee M, Van Tinteren H, Schumacher T, Haanen J. On the role of melanoma-specific CD8+ T-cell immunity in disease progression of advanced-stage melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (14): 4754-60.
230. Okamoto T, Irie RF, Fujii S, Huang SK, Nizze AJ, Morton DL, Hoon DS. Anti-tyrosinase-related protein-2 immune response in vitiligo patients and melanoma patients receiving active-specific immunotherapy. *J Invest Dermatol.* 1998; 111 (6): 1034-9.
231. Older-Aguilar AM, Guethlein LA, Adams EJ, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P. Coevolution of killer cell Ig-like receptors with HLA-C to become the major variable regulators of human NK cells. *J Immunol.* 2010; 185 (7): 4238-51.
232. Oliveira CC, van Veelen PA, Querido B, de Ru A, Sluijter M, Laban S, Drijfhout JW, van der Burg SH, Offringa R, van Hall T. The

- nonpolymorphic MHC Qa-1b mediates CD8+ T cell surveillance of antigen-processing defects. *The J. Exp. Med.* 2010, (1): 207-21
233. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (9): 713-25.
234. Palermo B, Campanelli R, Mantovani S, Lantelme E, Manganoni AM, Carelida G, Da Prada G, della Cuna GR, Romagne F, Gauthier L, Necker A, Giachino C. Diverse expansion potential and heterogeneous avidity in tumor-associated antigen-specific T lymphocytes from primary melanoma patients. *Eur J Immunol.* 2001; 31 (2): 412-20.
235. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009; 7: 86.
236. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3 (2): 108-22.
237. Parham P. Immunology. NK cells lose their inhibition. *Science.* 2004; 305 (5685): 786-7. 2004; 305 (5685): 786-7.
238. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 201-214.
239. Park, S. H. , T. Kyin, et al. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J Immunol.* 2003; 170 (3): 1197-1201.
240. Pascal V, Brunet C, Pradel V, Thirion X, Andre P, Faucher C, Sampol J, Dignat-George F, Blaise D, Vivier E, Chabannon C. Analysis of donor NK and T cells infused in patients undergoing MHC-matched allogeneic hematopoietic transplantation. *Leukemia.* 2002a; 16 (11): 2259-66. (a)
241. Pascal V, Vivier E, Andre P. CD158 (killer immunoglobulin-like receptors family) report. In: Mason D, Andre´ P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Hass M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Jones Y, Meuer S, Morrissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D,

- Turni L, Uguccioni M, van der Schoot M,
Vivier E, Zola H (eds) . Leucocyte Typing VII. White Cell Differentiation
Antigens. Oxford University Press: Oxford, 2002, 412–413. (b)
242. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey
RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter
SR, Look AT, Lee C, Fisher DE, Zon LI. BRAF Mutations Are Sufficient
to Promote Nevi Formation and Cooperate with p53 in the Genesis of
Melanoma. *Current Biology*. 2005; 15: 249–254.
243. Pedeux R. , et al. , Ultraviolet B sensitivity of peripheral lymphocytes as
an independent risk factor for cutaneous melanoma. *Eur J Cancer*, 2006;
42 (2): 212-5.
244. Petro A, Schwartz J, Johnson T. Current melanoma staging. *Clin
Dermatol*. 2004; 22 (3): 223-7.
245. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini JC, Romero P. Cutting
edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells
closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol*. 2000; 164
(3): 1148-52.
246. Planas Girón G. Melanoma Maligno: Relación con el estroma y la
dinámica de su comunicación intercelular. *Dermatología Venezolana*.
2003; 41 (4): 4-14.
247. Prada López MP, Cuesta Romero C, Zamora Parra B. 2000. WEB de
Cirugía Plástica y Reparadora. Disponible en URL: [http://www. secpre.
org/](http://www.secpre.org/)
248. Raghavan M. Immunodeficiency due to defective antigen processing: the
molecular basis for type 1 bare lymphocyte syndrome. *J Clin Invest* 1999;
103: 595-6.
249. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and
KIR genes influence disease. *J Exp Med*. 2005; 201 (7): 1025-9.

250. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol.* 2011, 46 (4): 216-28.
251. Ramirez-Montagut T, Turk MJ, Wolchok JD, Guevara-Patino JA, Houghton AN. Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene.* 2003; 22 (20): 3180-7.
252. Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Rondelli D, Testoni N, Nardi G, et al. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia.* 2001; 15 (8): 1161-4.
253. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 291-330.
254. Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin Cancer Biol.* 2007; 17 (6): 422-9.
255. Retsas S, Mastrangelo MJ. Reflecting on the 2001 American Joint Committee on Cancer Staging System for melanoma. *Semin Oncol.* 2007; 34 (6): 491-7.
256. Richards JO, Chang X, Blaser BW, Caligiuri MA, Zheng P, Liu Y. Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow. *Blood.* 2006; 108 (1): 246-52.
257. Riley, PA. , Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res,* 2003. 16 (5): 548-52.
258. Rios A, Rodriguez JM, Moya MR, Galindo PJ, Canteras M, Alvarez MR, Parrilla P. 2004. Frequency of HLA-C alleles in differentiated thyroid carcinoma in southeastern Spain. *Cancer* 100: 264-9
259. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76: 2421–38.
260. Rodgers JR, Cook RG. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 459-71.
261. Romero P, Ortega C, Palma A, Molina IJ, Pena J, Santamaria M.

- Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD4 (+) T cells in response to CD3-mediated stimulation. *J Leukoc Biol.* 2001; 70: 219-24
262. Roothans D, Smits E, Lion E, Tel J, Anguille S. CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e23037
263. Rosen DB, Bettadapura J, Alsharifi M, Mathew PA, Warren HS, Lanier LL. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J Immunol.* 2005; 175 (12): 7796–7799
264. Rousseau DL Jr, Gershenwald JE. The new staging system for cutaneous melanoma in the era of lymphatic mapping. *Semin Oncol.* 2004; 31 (3): 415-25.
265. Rovini D, Pellegris G, Cascinelli N, Cantoni L, Vaglini M, Placucci M, Santinami M, Belli F, Illeni MT. HLA antigens in familial and sporadic cutaneous melanoma. *Tumori.* 1988; 74 (6): 657-64.
266. Sandford KK, P. R. , Price FM, Radiation-induced chromatid breaks and DNA repair in blood lymphocytes of Patients with dysplastic nevi and/or cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol,* 1997; 109: 546-549.
267. Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j) . *J Exp Med.* 2003; 197 (7): 933-8.
268. Schachter J, Klein T, Klein B, Adler A. HLA class I and advanced melanoma in Israeli Jews. *Int J Oncol.* 1997; 10(3): 645-8.
269. Schäfer T, Merkl J, Klemm E, Wichmann HE, Ring J; KORA Study Group. The epidemiology of nevi and signs of skin aging in the adult general population: Results of the KORA-survey 2000. *J Invest Dermatol.* 2006; 126 (7): 1490-6.
270. Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathol Res Pract* 2010; 206: 1-8.

271. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003; 101 (9): 3730-40.
272. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol*. 2002; 169 (1): 239-47.
273. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8856-61.
274. Sovová Z, Kopecký V Jr, Pazderka T, Hofbauerová K, Rozbeský D, Vaněk O, Bezouška K, Ettrich R. Structural analysis of natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) extracellular domains suggests a conserved long loop region involved in ligand specificity. *J Mol Model*. 2011; 17 (6): 1353-70
275. Speiser, D. E. , M. J. Pittet, D. Valmori, R. Dunbar, D. Rimoldi, D. Lienard, H. R. MacDonald, J. C. Cerottini, V. Cerundolo, and P. Romero. In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1999; 190: 775. (a)
276. Speiser DE, Valmori D, Rimoldi D, Pittet MJ, Lienard D, Cerundolo V, et al. CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol*. 1999; 29 (6): 1990-9. (b)
277. Srivastava S1, Lundqvist A, Childs RW. Natural killer cell immunotherapy for cancer: a new hope. *Cytotherapy*. 2008; 10(8): 775-83.
278. Steffensen R, Christiansen OB, Bennett EP, Jersild C. HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion. *Tissue*

Antigens. 1998; 52: 569-72

279. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 13224-9.
280. Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, Moss AR, Beal SL, Ziegler JL, Saunders AM, Warner NL. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986; 38 (2): 161-77.
281. Stremmel C, Exley M, Balk S, Hohenberger W, Kuchroo VK. Characterization of the phenotype and function of CD8 (+) , alpha / beta (+) NKT cells from tumor-bearing mice that show a natural killer cell activity and lyse multiple tumor targets. *Eur J Immunol*. 2001; 31: 2818-28.
282. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28-and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011; 134 (1): 17-32.
283. Strohal R, Paucz L, Pehamberger H, Stingl G. T-cell receptor repertoire of lymphocytes infiltrating cutaneous melanoma is predominated by V alpha specificities present in T-cells of normal human skin. *Cancer Res*. 1994; 54: 4734-9.
284. Sun JC. Re-educating natural killer cells. *J Exp Med*. 2010; 207 (10): 2049-52.
285. Swetter SM. Malignant Melanoma. 2010.
<http://emedicine.medscape.com/article/1100753-overview>.
286. Sze, D. M-Y. , Giesajtis, G. , Brown, R. D. , Raitakari, M. , Gibson, J. , Ho, J. ,Baxter, A. G. , Fazekas de St Groth, B. , Basten, A. , Joshua, D. E. Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8+CD57+CD28-compartment. *Blood*. 2001; 98: 2817-2827.

287. Takahashi T, Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol.* 2006; 1; 176 (1): 211-6.
288. Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, Nicol A, Porcelli SA, Ishikawa Y, Tadokoro K, Hirai H, Juji T. Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 164 (9): 4458-64.
289. Tannous ZS, Mihm MC Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52(2): 197-203.
290. Tarazona R, Casado JG, Soto R, De la Rosa O, Peralbo E, Rioja L, Peña J, Solana R. Expression of NK-associated receptors on cytotoxic T cells from melanoma patients: a two-edged sword? *Cancer Immunol Immunother.* 2004; 53 (10): 911-24.
291. Tarazona R, De la Rosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev.* 2000; 121 (1-3): 77-88.
292. Tarazona R, De la Rosa O, Casado JG, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Galiani MD, Pena J, Solana R. NK-associated receptors on CD8 T cells from treatment-naive HIV-infected individuals: defective expression of CD56. *AIDS* 2002; 16: 197
293. Taurog JD. The role of HLA-B27 in spondyloarthritis. *J Rheumatol* 2010; 37: 2606-16.
294. Tel J, Schreiber G, Sittig SP, Mathan TS, Buschow SI, Cruz LJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood.* 2013; 121 (3): 459-67.
295. Tel J, Smits EL, Anguille S, Joshi RN, Figdor CG, de Vries IJ. Human

- plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood*. 2012; 120 (19): 3936-44.
296. Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res*. 2008; 101: 277-348. .
297. Terasaki P. I., McClelland J. D., Park M. S., McCurdy B. Microdotlet assay of human serum cytotoxins. En: *Manual of tissue typing techniques*. Ray J. G., Hare D. B., Pederson P. D., Kayhoe D. E (eds.). Department of Health, Education and Welfare Publications. Washington DC, 1974: 67-64.
298. Terasaki P. I., Bernoco F., Park M. S., Ozturk G., Iwaki Y. Microdotlet testing for HLA A, B, C and D antigens. *Am. J. Clin. Pathol*. 1978; 69: 103-120.
299. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999; 401: 921-923
300. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Eggermont AM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Sondak VK. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol*. 2011; 29 (16): 2199-205.
301. Thompson, J. A. Cutaneous melanoma. *The Lancet*, 2005; 365: 687-701.
302. Thompson, J. A. , The revised American Joint Committee on Cancer staging system for melanoma. *Semin Oncol*, 2002; 29 (4): 361-9.
303. Tomasello E, Bléry M, Vély F, Vivier E. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol*. 2000; 12 (2): 139-47.
304. Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Ng J, Hartzman RJ, Rosenberg SA. Melanoma-specific CD4+ T lymphocytes recognize human melanoma

- antigens processed and presented by Epstein-Barr virus- transformed B cells. *Int J Cancer*. 1994; 58 (1): 69-79. (a)
305. Topalian SL. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6 (5): 741-5. (b)
306. Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol*. 1998; 28 (12): 3959-67.
307. Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *Immunol Lett*. 2011; 137: 1-8.
308. Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD8 (+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52: 599-607
309. Ulbrecht M, Couturier A, Martinozzi S, et al. Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences. *Eur J Immunol*. 1999; 29: 537-47.
310. Ulbrecht M, Martinozzi S, Grzeschik M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol*. 2000; 164: 5019-22.
311. Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Strominger J. Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (24): 14326-31.
312. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 1997; 7 (6): 739-51.
313. Vallejo Delgado L. índice ultravioleta. Ed. Departamento de Física.

Universidad de Antofagasta. 2003.

<http://www.cmfotobiologia.com/divulgativo1/Indiceuv-Chile.pdf>

314. van Bergen J, Koning F. The tortoise and the hare: slowly evolving T-cell responses take hastily evolving KIR. *Immunology*. 2010; 131 (3): 301-9.
315. van Hall T, Wolpert EZ, van Veelen P, Laban S, van der Veer M, Roseboom M, Bres S, Grufman P, de Ru A, Meiring H, de Jong A, Franken K, Teixeira A, Valentijn R, Drijfhout JW, Koning F, Camps M, Ossendorp F, Kärre K, Ljunggren HG, Melief CJ, Offringa R. Selective cytotoxic T-lymphocyte targeting of tumor immune escape variants. *Nat Med*. 2006; 12 (4): 417-24.
316. Vetter CS, Straten PT, Terheyden P, Zeuthen J, Brocker EB, Becker JC. Expression of CD94/NKG2 subtypes on tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic melanoma. *J Invest Dermatol*. 2000; 114 (5): 941-7.
317. Vilches C. , Pando M. C. , Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D0 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 2000; 51: 639-646 (a).
318. Vilches C. , Rajalingam R. , Uhrberg M. , Gardiner C. M. , Young N. T. , Parham P. KIR2DL5, a novel Killer-Cell Receptor with a D0-D2 configuration of Ig-Likedomains. *J Immunol* 2000; 164: 5797-5804 (b).
319. Vilches C. , Parham P. KIR: diverse rapidly evolving receptors of innate and adaptative immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-251.
320. Vitale M, Sivori S, Pende D, Moretta L, Moretta A. Coexpression of two functionally independent p58 inhibitory receptors in human natural killer cell clones results in the inability to kill all normal allogeneic target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (8): 3536-40.
321. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004; 306 (5701): 1517-9.

322. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011; 331 (6013): 44-9.
323. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008; 27 (45): 5932-43.
324. Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res*. 2004; 29 (11): 2015-35.
325. Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E. Natural killer cells: from CD3⁺ NKp46⁺ to postgenomics meta-analyses. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 365-372
326. Wang EC, Taylor-Wiedeman J, Perera P, Fisher J. , BorysiewiczLK. Subsets of CD8⁺, CD57⁺ cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clin Exp Immunol*. 1993; 94 (2): 297-305.
327. Wang Y, Digiovanna JJ, Stern JB, Hornyak TJ, Raffeld M, Khan SG, Oh KS, Hollander MC, Dennis PA, Kraemer KH. Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (15): 6279-84.
328. Weekes, M. , Wills, M. , Mynard, K. , Hicks, R. , Sissons, J. , Carmichael, A. Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57⁺ CD28⁻ CD8⁺ T-cell population. *Immunology*. 1999; 98, 443–449.
329. Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990; 29: 131-42.
330. Werwitzke, S. , A. Tiede, B. E. Drescher, R. E. Schmidt, and T. Witte. CD8b/CD28 expression defines functionally distinct populations of peripheralblood T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol*. 2003; 133: 334–343.
331. Whiteside TL, Herberman RB. The biology of human natural killer cells.

- Ann Ist Super Sanita. 1990; 26 (3-4): 335-48.
332. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998; 161: 571-7.
333. Wong JL, Mailliard RB, Moschos SJ, Edington H, Lotze MT, Kirkwood JM, Kalinski P. Helper activity of natural killer cells during the dendritic cell-mediated induction of melanoma-specific cytotoxic T cells. *J Immunother*. 2011; 34 (3): 270-8.
334. World Health Organization. International Agency For Research On Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Solar and Ultraviolet Radiation. 1997; 55.
335. Wu, J. and L. L. Lanier. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90: 127-156.
336. Yamada I, Seki S, Ito S, Suzuki S, Matsubara O, Kasuga T. *Br J Cancer*. The effect of L-dopa on the potentiation of radiation damage to human melanoma cells. 1990; 62 (1): 33-6.
337. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*, 2008; 112: 2369–2380.
338. Yee C, Riddell SR, Greenberg PD. Prospects for adoptive T cell therapy. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 702-8.
339. Yokoyama WM, Kim S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity*. 2006; 24 (3): 249-57.
340. Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3 (4): 304-16.
341. Young P, Jackman L, Mooloy D, Green A. , A study of infertility

- treatment and melanoma. *Melanoma Res.* 2001; 11 (5): 535-41.
342. Yrlid U, Petersson E, Dohlsten M, Hedlund G. TCR alpha beta+ anti-tumor cytolytic T lymphocytes express NKR-P1 while the anti-tumor activity of TCR gamma delta+ T lymphocytes is not correlated to NKR-P1 expression. *Cell Immunol.* 1996; 173 (2): 287-94.
343. Zayour M, Lazova R. Congenital melanocytic nevi. *Clin Lab Med.* 2011. ; 31 (2): 267-80.
344. Zell JA, Cinar P, Mobasher M, Ziogas A, Meyskens FL Jr, Anton-Culver H. Survival for patients with invasive cutaneous melanoma among ethnic groups: the effects of socioeconomic status and treatment. *J Clin Oncol.* 2008; 26 (1): 66-75.
345. Zemmour J, Parham P. Distinctive polymorphism at the HLA-C locus: implications for the expression of HLA-C. *J Exp Med* 1992; 176: 937-50.
346. Zeromski J, Szczepanski M, Mozer L: Prevalence of CD56 /NCAM molecule in nervous system immune system and endocrine glands-accidental coincidence?. *Endokrynol Pol.* 2005; 56: 78–82
347. Zhang Z, Su T, He L, Wang H, Ji G, Liu X, Zhang Y, Dong G. Identification and functional analysis of ligands for natural killer cell activating receptors in colon carcinoma. *Tohoku J Exp Med.* 2012; 226 (1): 59-68.
348. Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol.* 2012; 3: 347.
349. Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol.* 2011; 32 (8): 364-72.
350. Huard B, Karlsson L. A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol.* 2000; 30 (6): 1665-75.

351. Morgado S, Sanchez-Correa B, Casado JG, Duran E, Gayoso I, Labella F, Solana R, Tarazona R. NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions. *J Innate Immun.* 2011; 3 (4): 365-73.
352. Mortha A, Diefenbach A. Natural killer cell receptor-expressing innate lymphocytes: more than just NK cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68 (21): 3541-55.
353. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology.* 2012; 12 (4): 239-52.

