



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio del Polimorfismo
de los Genes KIR Y NKG2D y sus
Ligandos HLA CLASE I y MICA en
Pacientes con Melanoma**

D. Helios Martínez Banaclocha

2018



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa de integración y modulación de
señales en biomedicina

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES KIR Y NKG2D Y SUS LIGANDOS HLA CLASE I Y MICA EN PACIENTES CON MELANOMA

Memoria presentada por el licenciado Helios Martínez Banaclocha para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 2018



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. María Ángeles Esteban Abad, Catedrática de Universidad del Área de Biología Celular en el Departamento de Biología Celular e Histología,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio del polimorfismo de los genes KIR y NKG2D y sus ligandos HLA-clase I y MICA en pacientes con melanoma", realizada por D. Helios Martínez Banaclocha, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de mayo de 2018

D. JOSÉ 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 Universitario Virgen de la Arrixaca del Servicio Murciano de Salud,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES KIR Y NKG2D Y SUS LIGANDOS HLA DE CLASE I Y MICA EN PACIENTES CON MELANOMA", realizada por D. HELIOS MARTÍNEZ BANACLOCHA, 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 7 de junio de 2018



Fdo.: José Antonio Campillo Marquina

Para todos aquellos que habéis formado parte de mi vida:

Para mis padres, a quienes tanto añoro,

Para mis hermanos,

Para mis compañeros y amigos,

Para todos vosotros,

A los que tanto quiero y admiro.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más sincero a todas aquellas personas que de una manera u otra han participado en la consecución de este trabajo.

Al Dr. José Antonio Campillo, por haberme ofrecido y alentado a participar en este trabajo desde mi llegada al Servicio de Inmunología del HCUVA, por haberme iniciado en el ámbito de la investigación, por haber dirigido esta tesis, por su ayuda incondicional, sus sabios consejos, su paciencia y su implicación para que este trabajo llegara a su fin.

A la Dra. M^a Ángeles Esteban (universidad de Murcia) por ser mi tutora y ofrecerme su ayuda durante estos años.

Al Dr. Jorge Martínez Escribano y todo el Servicio de Dermatología del HCUVA por su implicación en esta línea de investigación en melanoma desde sus inicios, por el reclutamiento, recogida de datos, clasificación y seguimiento de los pacientes y por todo el tiempo que han dedicado para completar la parte clínica de este estudio, sin la cual este trabajo no se hubiese podido realizar.

A los Dres. Rocío Álvarez López, Ana María García Alonso, Alfredo Minguela, Manuel Muro, Pedro Martínez, Rosa Moya y Marcos García por su amable acogida durante mis años de formación como residente en el Servicio de Inmunología del HCUVA, por hacer posible el desarrollo de este trabajo, y por haber sido tan importantes para mi formación profesional.

A las Dras. Ruth López y Lourdes Gimeno, por el gran trabajo realizado en este proyecto, por su ayuda y colaboración tanto en la parte técnica como en el análisis de datos y resultados. A Jose Miguel Bolarín por su ayuda en el análisis estadístico, sin vuestra ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Mi agradecimiento a mis compañeras Sandra Soriano y Beatríz de las Heras, por su excelente labor técnica en este trabajo, por siempre estar dispuestas a ayudarme, y hacerlo siempre con una sonrisa, y por su paciencia conmigo.

A M^a del Carmen García Calatayud, M^a José Sanchis y Jose Miguel Alemany por realizar las extracciones de sangre a los pacientes y ayudarme con la recogida de muestras, pero sobre todo, por hacer su trabajo siempre con humor y buena disposición, y por su afecto.

A mis compañeros Residentes de aquellos años, Fran, Ale, Gorka, Erika y Galian, por tantos momentos compartidos y por brindarme siempre su apoyo.

A Gema, mi compañera, cómplice y amiga, por tu amistad y ayuda incondicional, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por tu comprensión y cariño, y por tu gran corazón.

Agradezco a los pacientes su colaboración desinteresada en este trabajo, y la gran generosidad que demuestran al querer ayudar con su contribución a otras personas con su misma enfermedad.

Mi amor incondicional y agradecimiento a mis padres, Mariano y María, a los que tanto recuerdo y añoro; a mis hermanos y hermanas, Marcos, M^a Luisa, Miguel, Aurora, M^a Ada, Noe y Pedro, por siempre estar a mi lado, por vuestro cariño y comprensión.

“La historia de la ciencia nos demuestra que toda teoría es perecedera. Con cada verdad que nos es revelada ganamos un mejor entendimiento de la naturaleza, y nuestras concepciones y vicisitudes cambian por completo”

Nikola Tesla.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La producción científica obtenida mediante el presente trabajo ha sido la siguiente:

PUBLICACIONES

1. José Antonio Campillo Marquina; Ruth López Hernández; Helios Martínez Banaclocha; José Miguel Bolarín; Lourdes Gimeno; Anna Mrowiec; Manuela López; Beatriz Las Heras; Alfredo Minguela; María Rosa Moya Quiles; Isabel Legaz; José Francisco Frías Iniesta; Ana María García Alonso; María Rocío Álvarez López; Jorge Antonio Martínez Escribano; Manuel Muro. “*MHC Class I Chain-Related Gene A Diversity in Patients with Cutaneous Malignant Melanoma from Southeastern Spain*”. *Disease Markers*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/831864>.

2. José A Campillo; Isabel Legaz; M Rocío López Álvarez; José Miguel Bolarín; Beatriz Las Heras; Manuel Muro; Alfredo Minguela; María R Moya Quiles; Rosa Blanco García; Helios Martínez Banaclocha; Ana M García Alonso; M Rocío Álvarez López; Jorge A Martínez Escribano. “*KIR gene variability in cutaneous malignant melanoma: influence of KIR2D/HLA-C pairings on disease susceptibility and prognosis*”. *Immunogenetics*. 2013. 65 (5): 333-76.

3. “NKG2D polymorphism in cutaneous malignant melanoma”. (Artículo en preparación)

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	Adenina
ABC	Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa
ADAM	Familia de desintegrinas y Metaloproteasas
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	Comité conjunto estadounidense sobre el cáncer (del inglés " <i>American Joint Commite of Cancer</i> ")
APC	Aloficocianina
Asn	Asparagina
C	Citosina
DAP10	Proteína activadora de DNAX de 10 kDa
DAP12	Proteína activadora de DNAX de 12 kDa
DNAM1	Molécula accesorio 1 de DNAX (del inglés, " <i>DNAX Accessory Molecule-1</i> ")
EC	Expresión constitutiva
FAM	Amidita de Fluoresceina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
FSC	Disperción frontal de la luz (del inglés, " <i>Foward scatter</i> ")
G	Guanina
GC	Ganglio centinela
GPI	Glycosyl phosphatidylinositol
Hb 1	Bloque haplotípico 1
Hb 2	Bloque haplotípico 2
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
IC	Intervalo de confianza
Ile	Isoleucina
ITAM	Motivo activador basado en tirosina de inmunoreceptores
ITIM	Motivo inhibidor basado en tirosina de inmunoreceptores

KIR	Receptores tipo inmunoglobulina de células NK (del inglés, " <i>Killer Immunoglobulin-like receptor</i> ")
LAK	Células "killer" activadas por linfoquinas
LDH	Lactato deshidrogenasa
LES	Lupus eritematoso sistémico
Lys	Lisina
LRC	Complejo de receptores leucocitarios
Mb	Megabases
MD	Melanoma desmoplásico
ME	Melanoma espitzoide
MES	Melanoma de extensión superficial
Met	Metionina
MGB	Molécula de unión al surco menor
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIC	Secuencia polipeptídica relacionada con el MHC de clase I
MICA	Secuencia polipeptídica A relacionada con el MHC de clase I
MICB	Secuencia polipeptídica B relacionada con el MHC de clase I
MIS	Melanoma " <i>in situ</i> "
MLA	Melanoma lentiginoso acral
MLM	Melanoma lentigo maligno
MN	Melanoma nodular
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NK	Célula asesina natural (del inglés, " <i>Natural Killer</i> ")
NKC	Complejo de receptores de células NK
NKR	Receptores de células NK
NKT	Célula T asesina natural
OR	Razón de probabilidades (del inglés, " <i>Odds Ratio</i> ")
PB	Pacific Blue
PBS	Tampón fosfato salino
PCR-SSO	Reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos de secuencia

PCR-SSP	Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos de secuencia
PerCP	Clorofila Peridinina
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Conjugado Ficoeritrina-Cianina 5
PE-Cy7	Conjugado Ficoeritrina-Cianina 7
PLC-PI	Fosfatidilinositol fosfolipasa C
PVR	Receptor del poliovirus
RAETE1E	Transcrito temprano 1E del ácido retinoico
RAETE1G	Transcrito temprano 1G del ácido retinoico
SAPE	Estreptavidina cojugada con R-ficoeritrina
SEM	Error estándar de la media (del inglés " <i>Standard error of median</i> ")
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SSC	Dispersión lateral de la luz (del inglés, " <i>Side Scatter</i> ")
T	Timina
TBS	Tampón tris-salino
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Thr	Treonina
TMB	Tetrametilbencidina
TNM	Tumor-nódulos-metástasis (del inglés, " <i>Tumor-Node-Metástasis</i> ")
ULBPs	Proteínas de unión a UL-16
Ulc	Ulceración
Val	Valina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ETIOLOGÍA	14
2.1. Luz solar	14
2.2. Factores químicos	15
2.3. Factores hormonales	15
2.4. Factores genéticos	16
3. EPIDEMIOLOGÍA	17
4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS Y CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON MELANOMA	18
4.1. Tipos histológicos y clasificación del melanoma cutáneo	20
4.1.1. Melanoma de extensión superficial (MES)	25
4.1.2. Melanoma lentigo maligno (MLM)	26
4.1.3. Melanoma lentiginoso acral (MLA)	27
4.1.4. Melanoma nodular (MN)	28
4.1.5. Otros tipos de melanoma	28
4.2. Factores pronóstico para el estadiaje del melanoma cutáneo	29
4.2.1. Grosor tumoral o índice de Breslow	29
4.2.2. Ulceración	31
4.2.3. Tasa mitótica	31
4.2.4. Afectación linfática	31
4.2.5. Metástasis distales	33
4.2.6. Clasificación de los pacientes con melanoma según la AJCC	34
5. BIOLOGÍA DE LA CÉLULA DEL MELANOMA: INTERACCIÓN CON EL HUÉSPED	36
6. RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA EL MELANOMA	37
6.1. Respuesta inmunitaria mediada por células NK	37
6.2. Respuesta inmunitaria mediada por células T	44
7. RECEPTORES NATURAL KILLER (NKR) Y SUS LIGANDOS	45
7.1. Receptores KIR	49
7.2. Ligandos HLA clase-I de los receptores KIR	54
7.3. Interacción entre los receptores KIR y sus ligandos	57
7.4. Receptores tipo lectina-C	63

7.5. Receptor NKG2D	67
7.6. Polimorfismo del receptor NKG2D	69
7.7. Ligandos MICA del receptor NKG2D	71
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
PACIENTES Y MÉTODOS	80
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	81
2. DIAGNÓSTICO DEL MELANOMA	81
2.1. Inspección clínica	81
2.2. Dermatoscopia	82
2.3. Biopsia de la lesión cutánea	82
3. PACIENTES Y CONTROLES	82
3.1. Criterios de selección de pacientes	83
3.2. Variables demográficas, clínicas e histopatológicas	83
3.2.1. Variables demográficas y clínicas	83
3.2.2. Variables histológicas	84
4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	85
4.1. Biopsia selectiva de ganglio centinela	85
4.2. Extracción y amplificación del ADN	87
5. TIPAJE DE LOS GENES KIR	87
5.1. Tipaje de los genes KIR por PCR-SSP	87
5.2. Tipaje de los genes KIR por PCR-SSO	91
6. GENOTIPAJE DE LAS MOLÉCULAS HLA	92
6.1. Genotipaje de HLA-A y HLA-B por PCR-SSO	92
6.2. Genotipaje de HLA-C por PCR-SSO reversa	93
6.3. Genotipaje de HLA-C por PCR-SSP y PCR-SSO	95
7. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LA REGIÓN NKC MEDIANTE ENSAYO DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA	98
8. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN NKC	102
9. TIPAJE DEL GEN MICA	105
10. CITOMETRÍA DE FLUJO	106

10.1. Determinación de las poblaciones celulares que expresan receptores KIR en sangre periférica de pacientes con melanoma por citometría de flujo	106
10.2. Determinación de las poblaciones celulares que expresan NKG2D en sangre periférica de pacientes con melanoma por citometría de flujo	110
11. DETERMINACIÓN DE MICA SOLUBLE MEDIANTE ELISA	112
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	112
RESULTADOS	113
1. ESTUDIO GENÉTICO: SERIE ESTUDIADA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS	114
2. POLIMORFISMO DE LOS GENES KIR EN PACIENTES CON MELANOMA	116
3. POLIMORFISMO DE LOS LIGANDOS DE LOS RECEPTORES KIR EN PACIENTES CON MELANOMA	121
3.1. Dimorfismo en posición 80 de los ligandos HLA-C en el melanoma cutáneo	121
3.2. Epítomos Bw4 y Bw6 en pacientes con melanoma cutáneo	123
4. INFLUENCIA DE LOS PARES KIR/LIGANDO HLA-C EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y PRONÓSTICO DEL MELANOMA	125
5. LINFOCITOS TCD8+ Y CÉLULAS NK QUE EXPRESAN RECEPTORES KIR EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA	134
6. INFLUENCIA DE LOS GENES KIR, LIGANDOS HLA-I Y LOS PARES KIR-LIGANDO EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MELANOMA	142
7. POLIMORFISMO DE LA REGIÓN NKC EN PACIENTES CON MELANOMA	144
8. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO DE LOS SNP DE LA REGIÓN NKC Y ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE MELANOMA	150
9. LINFOCITOS T CD8+ Y CÉLULAS NK QUE EXPRESAN NKG2D EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA	156

10. POLIMORFISMO DEL GEN MICA EN PACIENTES CON MELANOMA	160
11. MICA SOLUBLE EN PACIENTES CON MELANOMA	165
12. INFLUENCIA DEL DIMORFISMO MICA-129 EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MELANOMA	168
DISCUSIÓN	170
CONCLUSIONES	187
BIBLIOGRAFÍA	190

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El melanoma cutáneo es una neoplasia originada a partir de la transformación maligna de los melanocitos (Figura 1), células productoras de melanina que residen en la capa basal epidérmica de la piel (Chudnovsky et al. 2005) (figura 1A). En las últimas décadas, el melanoma cutáneo ha adquirido un gran protagonismo debido a su agresividad, al incremento exponencial de su incidencia, al diagnóstico en individuos cada vez más jóvenes (Rigel et al. 1996; Álvarez Mon et al. 1997), y a que aunque representa solamente entorno al 4% de las neoplasias malignas cutáneas, causa aproximadamente el 79% de las muertes por cáncer de piel.

El melanoma se manifiesta clínicamente como una lesión pigmentada, a excepción de los melanomas acrómicos, que constituyen un problema de diagnóstico diferencial debido a que sus células han perdido la capacidad de sintetizar melanina.

La mayoría de los melanomas cutáneos pueden dividirse en dos patrones de crecimiento:

1. Patrón de crecimiento bifásico. Compuesto por una fase de crecimiento horizontal o radial, que consiste en la extensión centrífuga de los melanocitos transformados en el interior de la epidermis (figura 1B), y una fase de progresión o crecimiento vertical en la que las células del melanoma han penetrado la unión dermo-epidérmica con invasión dérmica (figura 1C).
2. Patrón de crecimiento monofásico. En este patrón puede no evidenciarse la fase de crecimiento radial, o ésta ser tan fugaz que no suele ser histológicamente reconocible y el tumor muestra exclusivamente proliferación de células melanomatosas en la epidermis que invaden directamente la dermis, bien como una masa o masas celulares contiguas, o también como células aisladas.

En el patrón de crecimiento bifásico, la proliferación del melanoma se caracteriza por la persistencia de la proliferación celular a nivel exclusivamente intraepidérmico o en la dermis papilar durante un período de tiempo variable, transcurrido el cual las células del melanoma que se encuentran en alguna de las zonas de crecimiento radial inician la invasión de la dermis, conocida como fase de crecimiento vertical. En esta fase el tumor adquiere la capacidad de metastatizar.

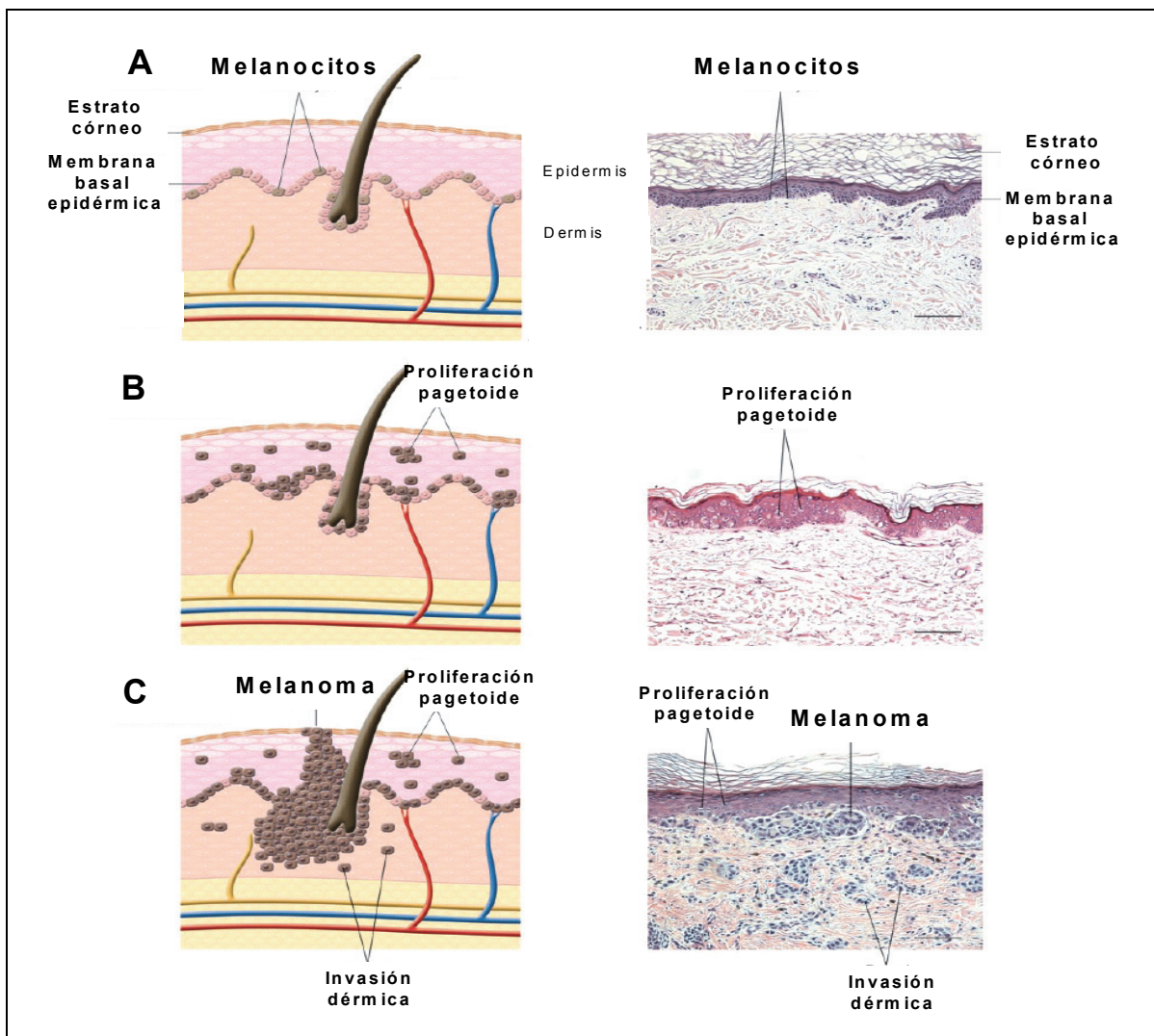


Figura 1. Fases de progresión histológica de la transformación de los melanocitos. Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina (parte derecha) y sus correspondientes representaciones gráficas (parte izquierda). (A) Piel normal. Distribución de los melanocitos normales en la membrana basal epidérmica. (B) Melanoma *in situ*. Las células de melanoma han migrado a la parte superior de la epidermis (proliferación pagetoide) y no han penetrado la membrana basal epidérmica. (C) Melanoma en fase de crecimiento vertical. Las células de melanoma muestran una proliferación pagetoide y han penetrado la unión dermo-epidérmica con invasión dérmica. Figura tomada y modificada de Chudnoyski et al., *J clin Invest* 2005; 115:813-24.

2. ETIOLOGÍA

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología del melanoma, la etiopatogenia de 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. Algunos de estos factores se describen a continuación:

2.1. 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, cuanto más corta es la longitud de onda, más 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 radiaciones UV-C que las UV-B y éstas más que las UV-A (Bernal-Pérez M, 2005). Las radiaciones UV-A necesitan grandes dosis para producir un efecto biológico, por lo que hasta hace pocos años eran consideradas inocuas. En cuanto a las radiaciones UV-B, se sabe, que en condiciones experimentales alteran el ADN celular y producen eritema en la piel humana y cáncer de piel en animales de experimentación. Las radiaciones 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.

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.

La incidencia de melanoma es mayor en latitudes más cercanas al ecuador y 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.

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

2.3. Factores hormonales

Su papel es poco claro y aunque la tasa de incidencia es 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.

2.4. Factores genéticos

En 1820, Norris describió por primera vez la variante hereditaria del melanoma que ha sido confirmada en numerosos estudios posteriores. Entre el 0,4 y el 12,3% de los pacientes tienen una historia familiar positiva, de hecho, la probabilidad de desarrollar melanoma y de que este se desarrolle a edades más precoces es 1.7 veces mayor en familiares de pacientes con melanoma que tienen una consanguinidad de primer grado que en la población general. En los pacientes afectados de melanoma familiar, la incidencia de aparición de melanomas primarios múltiples es del 12,3%, frente a un 2,8% en la población general.

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 vías celulares de gran importancia en la evolución del tumor como son la proliferación, la senescencia y la apoptosis celular. 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 mediante metilación del ADN y/o por alteraciones de la cromatina como en la modificación de las histonas) que afectan a la activación de oncogenes y genes supresores de tumores como el gen *CDKN2A* (del inglés, *cyclin - dependent kinase inhibitor 2A*), que se localiza en el cromosoma 9p21, presenta alta penetrancia y está involucrado en la patogénesis y en la progresión del melanoma (Goldstein et al., 2005; Laud et al., 2006), el gen *MC1R* (del inglés, *melanocortin receptor 1*) localizado en el cromosoma 16q24.3, los genes *BRAF* y *RAF* 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 regulan el crecimiento, la supervivencia y la invasión celular. Las mutaciones en *BRAF* están presentes en el 60% de los melanomas y, en el 80% de los melanomas asociados con la exposición intermitente al sol, mientras que son poco frecuentes en melanomas que aparecen por exposición crónica al sol o en regiones anatómicas poco o nada expuestas al sol (Maldonado et al., 2003).

El gen *PTEN* (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*) está localizado en el cromosoma 10q23.3 y se encuentra mutado en el 26%-48% de las células del melanoma metastásico. Este gen codifica una proteína con acción supresora tumoral que actúa regulando la división 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 del timoma viral , AKT (del inglés, *thymoma viral oncogene homolog*).

3. EPIDEMIOLOGÍA

El melanoma supone el 1% de las muertes por cáncer de cualquier etiología (Bernal-Pérez, 2005). 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.

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 lo que respecta a España, el melanoma cutáneo es más frecuente en mujeres que en hombres, con una frecuencia de 5,6 por cada cien mil y 4,8 por cada cien mil, respectivamente (Martinez - Escribano et al, 2012).

Actualmente, el melanoma es uno de los tumores malignos con mayor supervivencia. Según el estudio EURO CARE- 4, que ha analizado los datos de 83 registros de cáncer de 22 países europeos, la supervivencia relativa de los pacientes con melanoma maligno 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 personas menores de 15 años de ambos sexos. Los melanomas de 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, en la región de Murcia el riesgo de padecer melanoma es un 21% mayor en mujeres que en hombres. 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 mujeres, aunque muy alejada de las tasas más altas europeas o mundiales (Martínez-Escribano et al., 2012).

El melanoma es típicamente un tumor de adultos, aunque suele aparecer en edades más tempranas que la mayoría del resto de 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, de manera que existe un pico diagnóstico en la cuarta década de la vida, no obstante, los adolescentes también pueden desarrollar melanoma. 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.

4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS Y CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON MELANOMA

En el melanoma cutáneo, la lesión inicial consiste en una mácula asimétrica, de coloración irregular, con bordes dentados y un diámetro superior a 6 mm. Estas cuatro características clínicas más la evolución, variación o cambio del aspecto de la lesión en el tiempo es lo que se ha denominado el ABCDE del melanoma: A, asimetría; B, borde irregular; C, color no homogéneo; D, diámetro mayor de 6 mm y E, evolución (figura 2). Estas características no son exclusivas del melanoma y pueden observarse también en lesiones melanocíticas benignas.

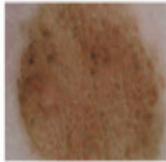

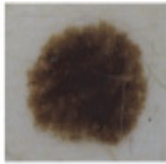
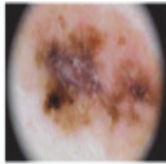
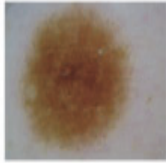
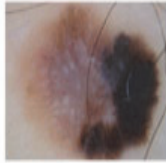
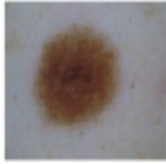
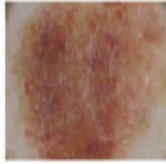
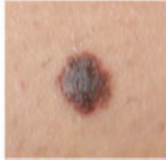
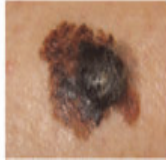
	Benigno		Maligno	
Simétricos		A Asimetría		Asimétricos (los dos lados no coinciden)
Bordes regulares		B Borde		Bordes irregulares
Color homogéneo		C Color		Color no homogéneo, dos o más tonos
Tamaño inferior a 6 mm (1/4 inch)		D Diámetro		Diámetro mayor a 6 mm (1/4 inch)
Lunar normal		E Evolución		Cambios en el tamaño, forma, color, o en otro aspecto

Figura 2. Regla ABCDE del melanoma. Características clínicas.

En la figura se representan la regla ABCDE del melanoma. (A) Asimetría, los melanomas malignos, a diferencia de los lunares benignos presentan una morfología asimétrica. (B) Borde, los melanomas malignos se presentan a menudo con un borde irregular, a diferencia de los lunares benignos que presentan bordes regulares. (C) Color, los melanomas malignos presentan un color no homogéneo con dos o más tonos, a diferencia de los lunares benignos que presentan un color homogéneo. (D) Diámetro, los melanomas malignos a menudo presentan diámetros mayores a 6 mm, mientras que en los lunares benignos el diámetro suele ser inferior a los 6 mm. (E) Evolución, los melanomas malignos experimentan cambios en el tamaño, forma, color u otros aspectos mientras que los lunares normales mantienen sus características en el tiempo. *Imagen obtenida de la Unidad dermatológica del HC Marbella International Hospital.*

4.1. Tipos histológicos y clasificación del melanoma cutáneo

Atendiendo a las características clínicas y anatomopatológicas del melanoma, a finales de la década de los 60 Clark y sus colaboradores propusieron una clasificación en relación a su localización anatómica (figura 3) y a los patrones de crecimiento (tabla 1). A saber:


- Melanoma de extensión superficial (MES)
- Melanoma léntigo maligno (MLM)
- Melanoma lentiginoso acral (MLA)
- Melanoma nodular (MN)

Las tres primeras formas de melanoma (MES, MLM y MLA) debutan con un crecimiento radial (Chudnovsky et al. 2005; Álvarez-Mon et al. 2005) y su crecimiento está limitado a la epidermis. Sin embargo, el MN se desarrolla desde el principio mediante un patrón de crecimiento vertical dérmico.


Tabla 1. 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




MELANOMA DE EXTENSIÓN SUPERFICIAL



MELANOMA LÉNTIGO MALIGNO



MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL



MELANOMA NODULAR

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, en el 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.

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 (Clark et al.; 1989), como se muestra en la figura 3, 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.

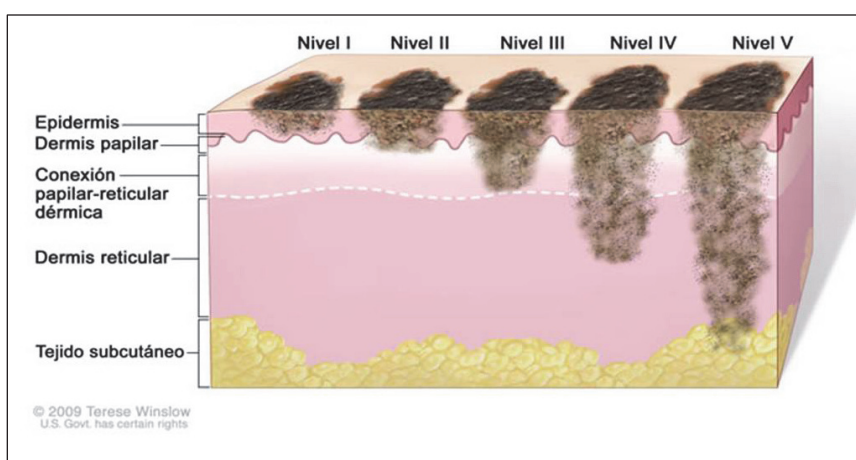


Figura 3. Niveles de Clark.

Los niveles de invasión de Clark, junto a otros parámetros como el grosor en milímetros del tumor o índice de Breslow (figura 4), 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., 1975; 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. Actualmente, tomado de forma aislada, se considera a este índice el indicador pronóstico más valioso. Según el gráfico de la figura 4, 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).

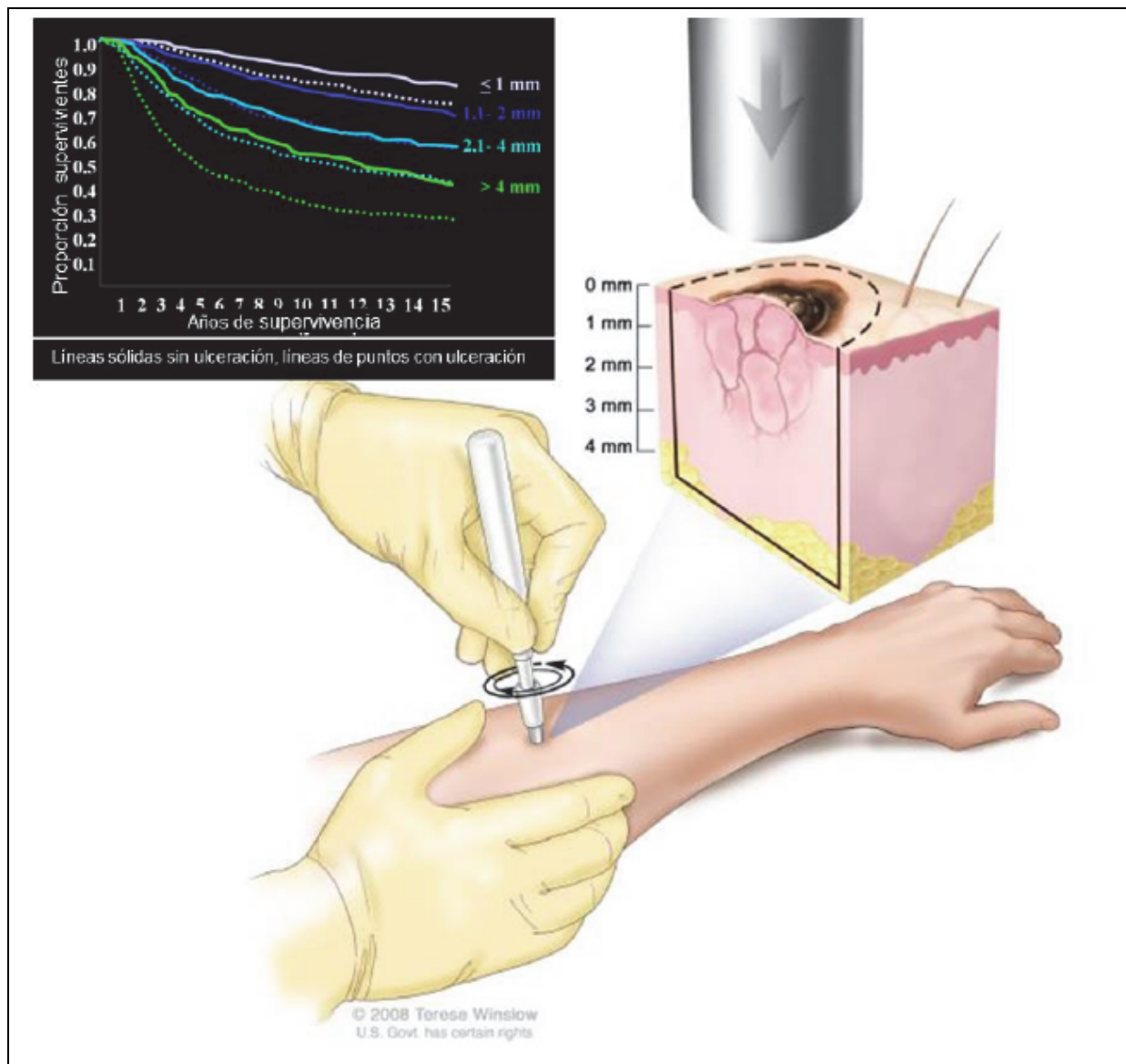


Figura 4. Índice de breslow. Se mide en mm con ocular milimetrado. En la parte superior izquierda se pueden observar las curvas de supervivencia de los grupos de pacientes con distinto grosor tumoral. Las líneas continuas corresponden a pacientes sin ulceración y las líneas de puntos con ulceración. *NCI visual online.*

4.1.1. Melanoma de extensión superficial (MES)

El MES es el tipo de melanoma más frecuente, representando entre un 40-70% de los melanomas en individuos 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). Es el tipo de melanoma que se asocia con mayor frecuencia a la presencia de nevus clínicamente atípicos y a exposiciones solares de carácter intermitente. Puede desarrollarse en personas 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, aunque puede llegar a alcanzar tamaños de 8 a 10 cm, palpable, con bordes y superficie irregulares, y puede presentar áreas claras que reflejan regresión del tumor. 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 ABCDE descritas en la figura 1 (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 la dermis reticular y el 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 que desarrollan MES tienen historia de un nevus aparentemente benigno en el sitio del melanoma. Los casos de tumores primarios múltiples (el 5% de los melanomas) suelen pertenecer a este tipo clínico-patológico y deben ser vigilados estrechamente y también se debe descartar la presencia de nevus atípicos personales o en sus familiares.

4.1.2. Melanoma lentigo maligno (MLM)

La frecuencia del MLM oscila entre el 4-15% de todos los melanomas en la raza caucásica y es raro en la raza asiática. Se localiza generalmente en la región facial, temporal y cuello, aparece sobre todo en personas mayores y se relaciona con la exposición solar (tabla 1).

Entre los factores de riesgo se incluye el reordenamiento de genes del cromosoma 10, específicamente en la región 10q24-26, la terapia con estrógenos y progesterona, y la aplicación de tintes de pelo no permanentes. La edad media del diagnóstico es de 65 años, aunque, en la actualidad, se está diagnosticando cada vez a edades más tempranas. Afecta con más frecuencia al sexo femenino en una proporción 4:1 con respecto al masculino, y no se asocia a la presencia de nevos 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 entre 5 y 15 años o incluso más, y se manifiesta como una mancha hiperpigmentada y 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 del MLM y en todo el lentigo maligno (LM), la parte inferior de la epidermis muestra una proliferación de melanocitos atípicos, como células aisladas y también en grupos. Los 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 et al, 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.

4.1.3. Melanoma lentiginoso acral (MLA)

El MLA constituye entre el 2% y el 8% de los melanomas en individuos caucásicos, mientras que en la raza negra la proporción se incrementa hasta un 60%-72%, en la oriental representa entre un 29% y un 46%, de igual modo que en los indios americanos (Swetter, 2010). Como su nombre indica, se localiza predominantemente en las palmas de las manos y plantas de los pies, en la matriz y/o lecho ungueal y en las 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 se desarrolla con más rapidez que en el MLM y en el 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 de Clark y no tener nódulo tumoral o su elevación ser apenas 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 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).

Los MES, MLM y MLA, en su estadio “*in situ*” (MIS), se caracterizan por una proliferación tumoral que se comporta biológicamente de forma benigna, con un buen pronóstico, aunque histopatológicamente sea maligna. 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.

4.1.4. 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 carnosos. Puede ser difícil distinguir el MN del 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 ABCDE (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 existe una variante polipoide con pedículo y aspecto de coliflor que es especialmente agresiva.

4.1.5. Otros tipos de Melanoma

Existen otras formas menos frecuentes de melanoma, 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 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. 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, en el iris, y tiene un patrón de mutaciones que difiere del patrón de los melanomas cutáneos o mucosos, además, la mortalidad en estos es elevada por la tendencia a la diseminación, especialmente hepática.

4.2. Factores pronóstico para el estadiaje del melanoma cutáneo

El sistema de estadiaje TNM (del inglés Tumor, Node, Metastasis) elaborado por el American Joint Comité on Cancer (AJCC), es el utilizado para clasificar a los pacientes de melanoma en distintos grupos pronóstico, y esta basado en el análisis de aproximadamente 38.900 pacientes con diagnóstico de melanoma cutáneo recogidos en la base de datos de la AJCC (Balch et al 2009). Los factores pronóstico incorporados en este sistema de estadiaje son el grosor del tumor primario o índice de Breslow, la presencia o ausencia de ulceración del epitelio suprayacente, la tasa mitótica y la afectación de los nódulos linfáticos regionales (Balch et al 2009).

4.2.1. Grosor tumoral o índice de Breslow

Según el grosor del tumor primario se definen cuatro categorías:

- T1: ≤ 1.0 mm
- T2: Desde 1,01 a 2.0 mm
- T3: Desde 2,01 a 4.0 mm
- T4: >4.0 mm

Dichas categorías son subdivididas en los grupos “a” y “b” en función de la presencia o ausencia de ulceración y/o de la tasa mitótica, como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los pacientes de melanoma según el grosor del tumor primario. Adaptada de *Edge et al 2010*.

Tumor primario		
TX	El tumor primario no puede ser ensayado (curación o regresión severa del tumor primario)	
T0	Sin evidencia de tumor primario	
Tis	Melanoma “ <i>in situ</i> ”	
T1	≤1.0 mm.	a: Sin ulceración y con <1 mitosis/mm ² b: Con ulceración o ≥1 mitosis/mm ²
T2	1.01 – 2.0 mm	a: Sin ulceración b: Con ulceración
T3	2.01 – 4.0 mm	a: Sin ulceración b: Con ulceración
T4	>4.0 mm	a: Sin ulceración b: Con ulceración

Según la AJCC, un incremento del grosor tumoral está correlacionado con un pronóstico significativamente peor (Balch et al 2009, Edge et al 2010). La supervivencia a 10 años disminuye progresivamente desde un 96% en pacientes con un grosor de la lesión primaria <0.5 mm a un 54% en pacientes con lesiones de un grosor de entre 4.01 y 6.0 mm. El grosor tumoral máximo se mide en ángulo recto a la superficie de la piel que rodea la masa tumoral. El punto de referencia superior es la parte superficial de la capa de células granulares de la epidermis o la base de la lesión si el tumor es ulcerado, y el punto de referencia inferior es el punto más profundo hasta el que llega la invasión, y está representado por grupos de células desprendidas de la zona inferior de la masa tumoral (figura 4).

4.2.2. Ulceración

La ulceración se define como la ausencia de un epitelio intacto alrededor del melanoma, y constituye un factor pronóstico importante en el sistema de estadiaje de la AJCC en tumores primarios. La evolución de los pacientes con tumores primarios ulcerados es peor que la de aquellos pacientes que presentan un tumor primario no ulcerado del mismo grosor (figura 4, parte superior izquierda).

4.2.3. Tasa mitótica

La tasa mitótica fue incorporada en el año 2010 al sistema de estadiaje TNM, al observarse que constituía el segundo factor pronóstico más importante en 11.664 pacientes con melanoma localizado (Balch et al 2009, Edge et al 2010, Thompson et al 2011). En esta serie de pacientes, se observó una correlación entre el incremento de la tasa mitótica y el descenso de las tasas de supervivencia (Thompson et al 2011). La tasa de supervivencia a 10 años disminuye progresivamente desde un 93% para aquellos pacientes con <1 mitosis/mm² a un 48% en aquellos pacientes con >20 mitosis/mm². La medida se realiza identificando el área de la dermis que contiene la mayoría de las mitosis, denominada “hot spot” o punto caliente, y realizando un recuento del número de mitosis en los campos adyacentes al mismo dentro de un área total de 1 mm² (Edge et al 2010, Thompson et al 2011).

4.2.4. Afectación linfática

Los nódulos linfáticos regionales son un lugar común de diseminación metastásica del melanoma cutáneo. La presencia de metástasis en los nódulos linfáticos regionales de pacientes con melanoma tiene un gran impacto negativo en la evolución a largo plazo de los mismos.

Todos los pacientes con afectación de los nódulos linfáticos regionales confirmada histológicamente, y sin presencia de metástasis distales, son clasificados dentro del estadio III, independientemente del grado de crecimiento tumoral existente en los nódulos.

Existen dos tipos de metástasis que afectan a los nódulos linfáticos: las micrometástasis y las macrometástasis. Las micrometástasis se diagnostican anatomopatológicamente tras la realización de una biopsia de ganglio centinela y

una linfadenectomía completa en pacientes sin evidencia clínica, o mediante técnicas de imagen que demuestren la presencia de metástasis regionales (Balch et al 2009, Edge et al 2010), mientras que las macrometástasis, se definen como la presencia de tumor en los nódulos linfáticos, demostrada histológicamente y detectada clínicamente o por imagen, tras la realización de una linfadenectomía terapéutica. En la tabla 3 se recoge la clasificación en función de la afectación de los nódulos linfáticos (N) definida en el sistema de estadiaje TNM del año 2010.

Tabla 3. Clasificación de los pacientes con melanoma en función del grado de afectación de los nódulos linfáticos según el sistema de estadiaje TNM del año 2010.

Adaptada de *Edge et al 2010*.

Nódulos linfáticos regionales (N)	
NX	Pacientes en los que no se han podido extraer y analizar los nódulos linfáticos. (ej. aquellos pacientes en los que se han extraído previamente por otras razones).
N0	Pacientes en los que no se detectan metástasis regionales.
N1	Pacientes con un nódulo linfático afectado: a: micrometástasis b: macrometástasis
N2	Pacientes con dos o tres nódulos linfáticos afectados o metástasis regional intralinfática sin metástasis nodal: a: micrometástasis b: macrometástasis c: metástasis en tránsito/satélite sin nódulos linfáticos metastásicos
N3	Pacientes con cuatro o más nódulos linfáticos metastásicos, o metástasis en tránsito/satélite con nódulos linfáticos metastásicos

Aunque todos los pacientes con presencia de metástasis en los nódulos linfáticos regionales se clasifican dentro del estadio III, las implicaciones pronósticas varían dependiendo del grado de crecimiento del tumor en los nódulos linfáticos y de otras características del tumor primario. Para pacientes con micrometástasis en los

nódulos linfáticos, el factor más importante que afecta al pronóstico es el número de nódulos afectados. Otros factores que afectan al pronóstico de pacientes con micrometástasis de manera independiente son la edad y varias características del tumor primario al diagnóstico, como la localización anatómica del tumor, el grosor, la ulceración y la tasa mitótica.

En pacientes con macrometástasis en los nódulos linfáticos regionales, el número de nódulos linfáticos afectados está significativamente asociado con el pronóstico. Sin embargo, las características del tumor primario no están asociadas de manera independiente con el pronóstico, a diferencia de lo que ocurre en pacientes con presencia de micrometástasis (Balch et al 2010).

4.2.5. Metástasis distales

Los pacientes con metástasis distales se subclasifican según la localización a la que afecta la metástasis y el nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero (Balch et al 2009, Edge et al 2010), como se muestra en la tabla 4. El nivel de LDH en suero constituye un factor pronóstico independiente e importante en pacientes con melanoma diseminado. La tasa de supervivencia a uno y dos años es significativamente mayor en aquellos con un nivel sérico de LDH normal en comparación con aquellos que tienen un nivel de LDH elevado en suero.

Tabla 4. Clasificación de los pacientes con melanoma que presentan metástasis distales según el sistema de estadiaje TNM del año 2010. Adaptada de Edge et al 2010.

Metástasis a distancia (M)	
M0	Ausencia de metástasis distales.
M1a	Metástasis distales en piel, tejido subcutáneo, o nódulos linfáticos, con niveles séricos de LDH normales. Asociado con mejor pronóstico.
M1b	Pacientes con metástasis pulmonares y con niveles normales de LDH en suero. Tienen un peor pronóstico que aquellos con metástasis en piel, subcutáneas y en nódulos linfáticos, pero mejor pronóstico que aquellos con metástasis en otras localizaciones viscerales.
M1c	Pacientes con metástasis en otras localizaciones viscerales y con unos niveles de LDH normales o aumentados. Tienen peor pronóstico que el resto de pacientes.

4.2.6. Clasificación de los pacientes con melanoma según la AJCC

El sistema de estadiaje TNM del año 2010 agrupa a los pacientes en categorías pronósticas basándose en la evaluación del tumor primario (T), la presencia o ausencia de metástasis en los nódulos linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis distales (M) (Balch et al 2009; Edge et al 2010). De esta manera, los pacientes se clasifican en cuatro estadios (tabla 5).

Tabla 5. Clasificación en categorías pronósticas de los pacientes de melanoma según el sistema de estadiaje TNM de la AJCC del año 2010. Tabla adaptada de *Edge et al 2010*.

Estadiaje clínico	Tumor primario	Nódulos linfáticos regionales	Metástasis distales
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
Estadio IB	T1b	N0	M0
Estadio IIA	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
Estadio IIC	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
Estadio III	Cualquier T	N1,N2 o N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tis, Melanoma “*in situ*”; T1, ≤ 1 mm; T2, 1.01-2 mm; T3, 2.01-4 mm; T4, >4 mm; a, sin ulceración; b, con ulceración; N0, ausencia de metástasis regionales; N1, un nódulo linfático afectado; N2, dos o tres nódulos linfáticos afectados; N3, cuatro o más nódulos linfáticos afectados o presencia de metástasis en tránsito; M0, ausencia de metástasis distales; M1, presencia de metástasis distales.

Estadio I

Incluye pacientes con melanoma primario de bajo riesgo (T1a, T1b y T2a) y sin evidencia de metástasis regionales o distales. Se divide en los estadios IA y IB en base al grosor de la lesión primaria, su tasa mitótica, y la presencia o ausencia de ulceración.

Estadio II

Incluye pacientes con tumores primarios que tienen alto riesgo de recurrencia (T2b, T3a, T3b, T4a y T4b), pero sin evidencia de metástasis regionales o distales. Se divide en los estadios IIA, IIB, y IIC, dependiendo del grosor tumoral y la presencia o ausencia de ulceración.

Estadio III

Incluye aquellos pacientes con evidencia de metástasis en nódulos linfáticos regionales o con presencia de metástasis satélite o en tránsito (N1, N2 ó N3). Los pacientes incluidos en este estadio son subclasificados en IIIA, IIIB o IIIC, dependiendo del grado de afectación linfática.

Estadio IV

Incluye pacientes con presencia de metástasis distales (M1). No existe una clasificación en subgrupos. Los pacientes en los que se detecta la presencia de metástasis en nódulos linfáticos, piel, o tejido subcutáneo, sin un melanoma primario identificado, se clasifican dentro del estadio III, asumiendo que no existe enfermedad en otras localizaciones, mientras que los pacientes con presencia de metástasis en otras localizaciones diferentes a las anteriores y sin un melanoma primario identificado se clasifican dentro del estadio IV.

5. BIOLOGÍA DE LA CÉLULA DE MELANOMA: 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. 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 favorecer o suprimir dicho proceso.

La célula transformada acumula alteraciones genéticas que le confieren una descontrolada e intensa capacidad de proliferación. Estas modificaciones genéticas también conllevan la síntesis de proteínas potencialmente reconocibles por el sistema inmune, denominadas antígenos asociados al tumor.

Desde un punto de vista biológico, también se ha detectado la presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos asociados al tumor tanto en sangre periférica de pacientes de melanoma, como en nódulos linfáticos metastásicos (van Oijen et al. 2004; Lee et al. 1999; Palermo et al. 2001; Mihm et al. 1996).

Desde un punto de vista clínico, la intervención del sistema inmunitario en la lucha frente al 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, 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 (Leveque et al. 2000). 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 contra el tumor, que ocurre en un gran número de pacientes, las remisiones espontáneas son extremadamente raras.

6. 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, como linfocitos T y B, y células Natural Killer (NK), cuya respuesta frente al melanoma comienza con el reconocimiento de dichos antígenos.

Diversos resultados experimentales y hallazgos clínicos indican que la respuesta inmunitaria constituye un mecanismo muy importante en el control de la proliferación del melanoma, así como de su diseminación hematógena y anidación metastásica. Sin embargo, se ha comprobado que los pacientes con melanoma, presentan deficiencias funcionales en diversas subpoblaciones linfocitarias, que podrían derivar en un estado de tolerancia frente al tumor. Así, se han descrito alteraciones en la producción de citocinas, por parte de los linfocitos T, implicadas en la activación de linfocitos T citotóxicos y células NK, y se ha comprobado la existencia de defectos en la capacidad lítica de las células efectoras citotóxicas (Jovi A 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, y aunque parezca paradójico, la inmunidad frente al tumor coexiste frecuentemente con la progresión tumoral (Jiang et al. 2007).

6.1. 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 receptor de la célula T (TCR) o las inmunoglobulinas (Igs) de las células B, sí están equipadas de un grupo de receptores que les permiten reconocer, discriminar y actuar sobre sus potenciales dianas. En efecto, la homeostasis y función de estas células está regulada por una serie de receptores que transmiten señales activadoras o 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. 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 TCR o los de las 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 detectar sus dianas.

Respecto a su origen, 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*) (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 de 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 tanto en células NK como en 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 CD3-CD56⁺ expresan poco o nada NKp46. Por tanto, 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.

En humanos, desde muy temprano se identificaron dos subclases de células NK según 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 5 y 6). 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-CD56⁺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 tejido linfóide secundario son CD56^{bright} y producen gran cantidad de citoquinas y quimioquinas (Cooper et al., 2001a) a los minutos de su activación, pero sin

embargo, estas células CD56^{bright} tienen poca o ninguna capacidad citotóxica (figuras 5 y 6). Por el contrario, dentro de las células NK circulantes en sangre, el 90% expresan la molécula CD56 con una baja densidad (células NK CD56^{dim}) y altos niveles de CD16.

Aunque el significado funcional de la molécula CD56 sobre las 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 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 a través de un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de 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).

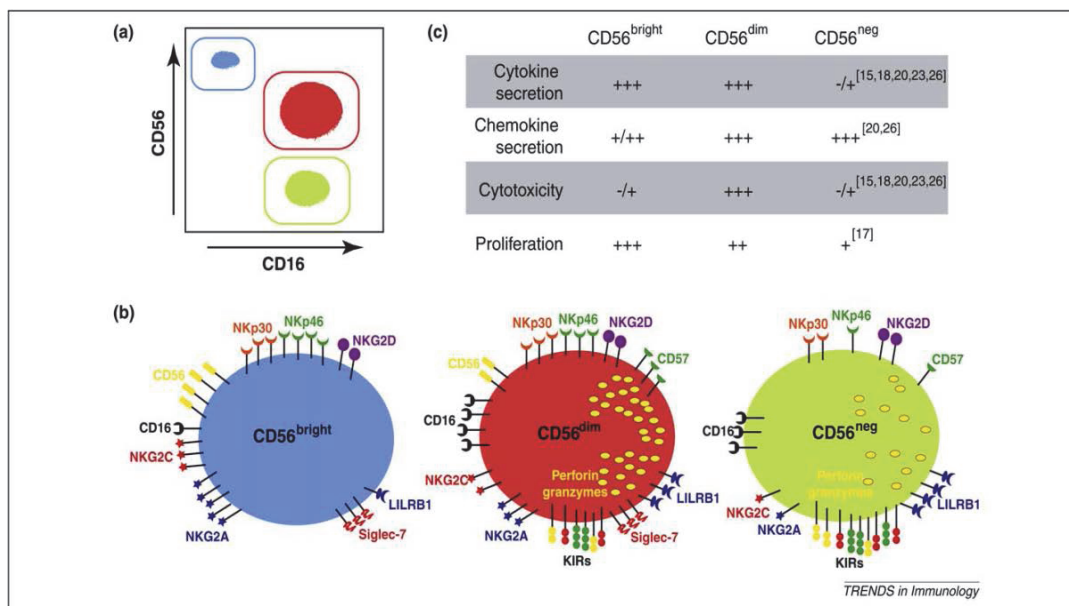


Figura 5. Propiedades fenotípicas y funcionales de las células NK CD56^{bright}, CD56^{dim} y CD56^{neg}. (a) Ilustración esquemática del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD56 y CD16 previa selección de la población linfóide con fenotipo CD3-CD4-CD14-CD19-: (azul), NK CD56^{bright}, (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) (figura 7), 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*), se expresa mayoritariamente en la superficie de la subclase de células NK CD56^{dim} y, a diferencia de ellos, los receptores KLR de la

familia de las lectinas tipo C como los heterodímeros CD94/NKG2 se expresan principalmente en la subclase de células NK CD56^{bright} (figura 6).

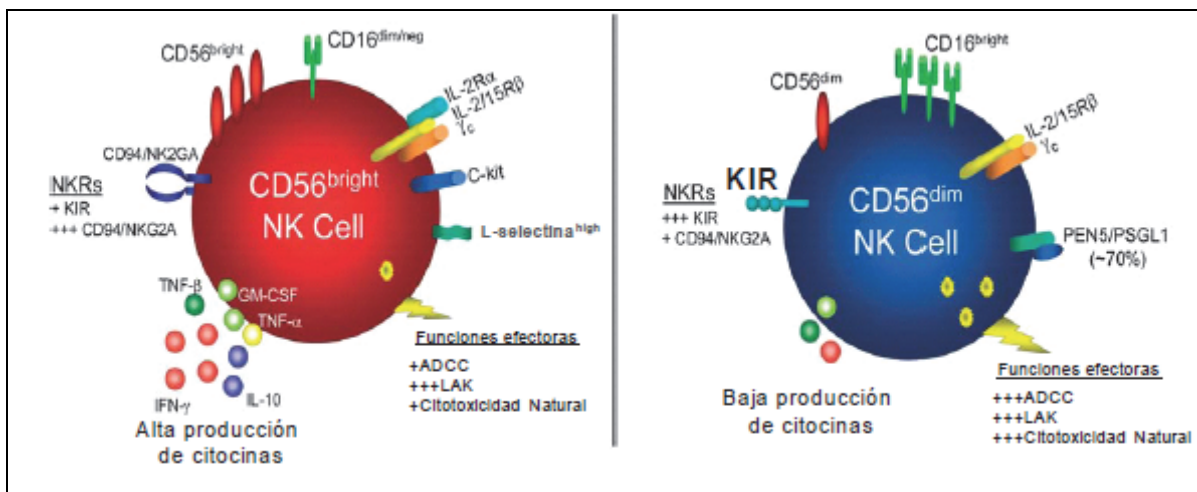


Figura 6. Subclases de células NK humanas según la expresión de la molécula CD56.

Las células CD56^{bright} son predominantemente inmunoregulatoras y producen grandes cantidades de citoquinas. Esta subclase presenta una baja expresión de CD16 y una citotoxicidad natural y ADCC bajas. Por el contrario, las células CD56^{dim} son esencialmente efectoras citotóxicas y expresan receptores KIR capaces de modular su actividad citotóxica. Cooper MA et al. *Blood*. 2001; 97: 3146-51.

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 a través de un mecanismo que es dependiente de perforina (Nasca et al., 1999; Jovic et al., 2001). 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.

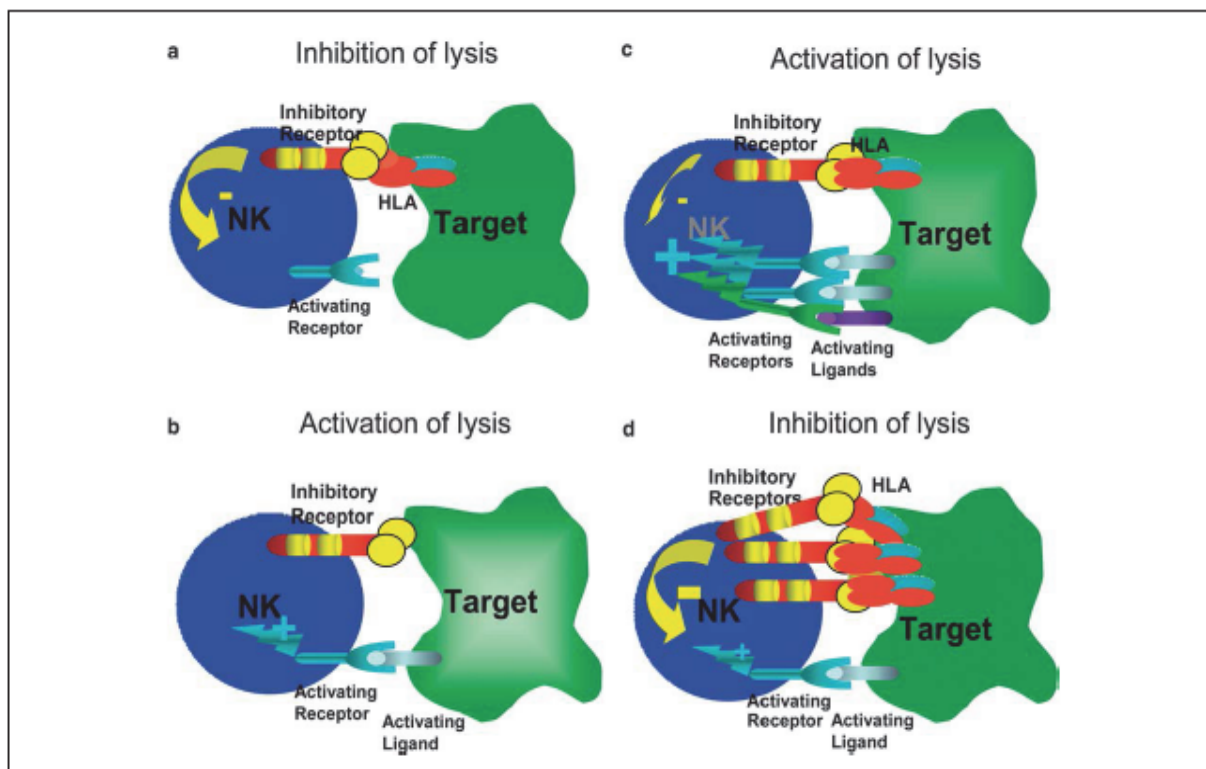


Figura 7. Regulación de la respuesta de las células NK mediante el balance de señales de activación e inhibición. La respuesta de las células NK está regulada por un equilibrio de señales de receptores activadores e inhibidores. (a) En ausencia de una interacción entre el receptor activador/ligando, la lisis se inhibe cuando receptores inhibidores (KIR) reconocen e interaccionan con moléculas HLA de clase I en la superficie de la célula diana. (b) La lisis se produce cuando los receptores activadores interaccionan 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 interaccionar 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 la 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. Figura adaptada de *Farag SS et al. Blood. 2002; 100: 1935-47.*

6.2. Respuesta inmunitaria mediada por células T

La inmunidad celular juega un papel muy importante en la respuesta inmunitaria contra el melanoma. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una respuesta inmunitaria mediada por células T activadas dirigida contra antígenos asociados a melanoma en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* (Ramírez-Montagut et al. 2003). Durante los últimos años, se ha progresado en la identificación y caracterización de muchos antígenos asociados a melanoma y restringidos por MHC de clase I, reconocidos por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Van Oijen et al. 2004). Estos antígenos pertenecen a tres grupos principales: Grupo 1: Antígenos no específicos de cáncer de tipo melanoma (e.g. MAGE, BAGE, PRAME, y NY-ESO-1). Grupo 2: Antígenos de diferenciación melanocítica (e.g. tirosinasa, Melan-A/MART-1, gp100, TRP-1 y TRP-2). Grupo 3: 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 MHC de clase II procedentes de antígenos de melanoma (Heinzel et al 2001; Topalian et al 1994).

El desarrollo de la tecnología de complejos tetraméricos consistente en moléculas de MHC 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 ha permitido profundizar en el conocimiento de la respuesta inmunitaria contra los antígenos del melanoma. Por otra parte, la expansión "*in vitro*" de células T específicas ha permitido la caracterización funcional de diferentes subclases de células T que intervienen frente al melanoma (Bullock et al 2001). Tales abordajes han revelado que diferentes antígenos asociados al melanoma pueden estimular una respuesta tanto de células T CD8⁺ como de células T CD4⁺ específica del tumor (Li et al 1994). No obstante, las células tumorales pueden eludir la inmuno-vigilancia del huésped, sobre todo si se induce un estado de tolerancia, existiendo la necesidad, al igual que se ha apuntado en el caso de las células NK, de conocer los diferentes mecanismos implicados en la inmunosupresión derivada de la enfermedad, como responsable de la diseminación de la misma.

7. RECEPTORES NATURAL KILLER (NKR) Y SUS LIGANDOS

Entre los diferentes componentes del sistema inmunitario, los linfocitos T CD8⁺ TCR αβ⁺ y las células NK son importantes efectores citotóxicos implicados en la defensa frente al melanoma (Lee et al. 1999; Jovic et al. 2001). La actividad citotóxica de estas células está regulada a través del balance entre señales de activación e inhibición mediadas por un grupo de receptores, originariamente identificados en células NK (NKR), pero también descritos en células T (Long et al. 1999; Parham, 2003; Vivier et al. 2004). En este contexto, se ha caracterizado un número creciente de inmunoreceptores, tanto específicos como no específicos de moléculas HLA de clase I.

Entre los receptores no específicos de HLA encontramos las moléculas CD57, CD56 y CD161, también denominada NKR-P1A (Pittet et al. 2000; Brenchley et al. 2003; Lanier et al. 1994). CD57 es una glucoproteína de superficie celular que ha sido implicada en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Diversos estudios han mostrado un incremento de células T CD8⁺CD57⁺ en individuos con infección por citomegalovirus y en pacientes con tumores (Weekes et al. 1999; Sze et al. 2001), que generalmente se presenta como una expansión oligoclonal dentro del compartimento de células T CD8⁺CD28⁻. Una expansión de células con estas características fenotípicas también ha sido asociada con la edad, probablemente debido a una estimulación antigénica repetida (Merino et al. 1998).

CD56 es una isoforma de la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM), que está implicada en uniones homotípicas y heterotípicas entre células citotóxicas y células diana, aunque su función precisa, tanto en células NK como en células T, todavía no ha sido dilucidada (Lanier et al. 1991).

Al contrario que en las células NK, la expresión de CD56 en células T no es constitutiva. Así, se ha encontrado que el porcentaje de células T CD56⁺ está disminuido en pacientes con infección por VIH (Tarazona et al. 2002). Además, es de destacar que la población de células T CD8⁺CD56⁺ generalmente contiene altas cantidades de perforina y granzima B intracelular, y que la expresión de CD56 sobre células T CD8⁺ se correlaciona con su actividad citotóxica (Pittet et al. 2000).

La molécula CD161 (NKR-P1A) es una glucoproteína perteneciente a la familia de las lectinas de tipo C que, a diferencia del resto de NKRs, se expresa en

linfocitos T CD8⁺CD28⁺ (Speiser et al. 1999), además de ser una molécula específica de células NKT (Takahashi et al. 2000). Aunque inicialmente fue descrita como una molécula asociada con citotoxicidad en células T (Yrlid et al. 1996), recientemente se ha observado que el receptor humano NKR-P1A puede inhibir la actividad citotóxica de las células NK (Rosen et al. 2005). No obstante, la interacción entre este receptor y su correspondiente ligando regula de un modo diferente la función de las células NK y células T (Aldemir et al. 2005).

Respecto a los receptores que reconocen moléculas HLA de clase I, se encuentran, entre otras, las familias de receptores KIR y de receptores lectina de tipo C, que participan en la regulación de la actividad citotóxica de las células NK y T CD8⁺ (McQueen et al. 2002; Ohkawa et al. 2001).

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 7). Además, 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 reposo 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 receptores activadores de las células NK ayudan a resolver la cuestión de cómo las células NK reconocen sus dianas potenciales (Lanier, 2003).

En este contexto, se han caracterizado un número creciente de inmunoreceptores, que regulan funciones estimuladoras o inhibitoras, entre los que se encuentran los receptores KIR, los receptores KLR, los receptores leucocitarios tipo inmunoglobulina LILR (del inglés, *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors*) y los receptores NCR (del inglés, *Natural Cytotoxic Receptors*) (Lanier, 2005; McQueen et al., 2002; Vivier et al., 2011). Destacar que los receptores KIR se expresan de una manera estocástica por lo que cada clon de células NK de un individuo determinado no expresa el conjunto completo de receptores codificados por los genes de esas

moléculas presentes en su genoma, sino que expresa únicamente un grupo de 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 amplio rango de situaciones y con capacidades funcionales diferentes que las hace críticas para la rápida detección y acción frente a células diana infectadas y/o transformadas.

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., 1996; Moretta et al., 1997). 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 7), 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 frente a las células patológicas se incrementa gracias a que las células diana expresan determinadas moléculas inducibles por estrés que actúan como ligandos para los receptores NK, entre estos ligandos se encuentran las moléculas MIC-A y MIC-B (Fuertes et al., 2008), reconocidas por NKG2D, que son proteínas codificadas dentro de la región HLA humana y cuya estructura está relacionada con las moléculas HLA de clase I y otras moléculas como la ULBP (del inglés, *UL16-Binding Protein*) y

RAET (del inglés, *Retinoic Acid Early Transcript*), 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 el resultado del balance entre las fuerzas inhibitoras inducidas por interacciones “*missing self*” o “pérdida de lo propio” en oposición a las señales activadoras desencadenadas por la estimulación de los receptores activadores con sus ligandos “*induced self*” o “inducción de lo propio” (Malarkannan, 2006; Farag et al, 2006; Mistry et al, 2007).

En los últimos años se ha descrito una asociación entre ciertas subclases de linfocitos T CD8⁺ y células NK que expresan estos receptores y diferentes patologías (Rajagopalan and Long, 2005), como enfermedades infecciosas por virus (Khakoo et al, 2004; Jacobs et al, 2004; Boulet et al, 2008; Alter et al, 2009; Dring et al, 2011; Wauquier et al, 2010), enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Nelson et al, 2004; Nickoloff et al, 1999; Holm et al, 2005; Niepiekło-Miniewska et al, 2013; Hou et al, 2010; García-León et al, 2011; Martin et al, 2002) y enfermedades tumorales (Vetter et al, 2000; Carrington et al, 2005; Ozturk et al, 2012; Venstrom et al, 2012; Cooley et al, 2010), que sugiere un papel relevante de estos receptores en la patogénesis y progresión de dichas enfermedades.

7.1. Receptores KIR

La historia de los receptores KIR se ha desarrollado durante las últimas tres décadas. Poco después del descubrimiento de las células NK a mediados de la década de 1970 (Kiessling et al 1975, Herberman et al 1975) se comienza a sospechar que las moléculas MHC clase I pueden ser importantes para regular las respuestas de las células NK (Trinchieri et al 1978, Becker et al 1978, Piontek et al 1985). Posteriormente se postula la hipótesis de "*missing-self*" o pérdida de lo propio (Kiessling et al 1975, Herberman et al 1975, Karre et al 1986), la cual sugería que las células NK podrían expresar receptores inhibidores con afinidad por moléculas MHC clase I.

En 1992, el descubrimiento de la inhibición a través de los receptores Ly49 por moléculas MHC clase I en ratones transformó la hipótesis del missing-self en un dogma aceptado hasta la actualidad (Trinchieri et al 1978, Becker et al 1978, Piontek et al 1985, Karlhofer et al 1992). Poco después, se identificó a los receptores inhibidores humanos que se unen a HLA-C (KIR2DL1/P58.1/EB6 y KIR2DL3/P58.2/GL183) (Moretta A et al 1993, Moretta A et al 1990) y HLA-B (NKB1/KIR3DL1) (Litwin et al 1994), como análogos funcionales del receptor murino Ly49. Posteriormente, Moretta y sus colaboradores descubrieron que el clon de anticuerpo monoclonal EB6 también podía reconocer un segundo receptor p50 (KIR2DS1) que transmitía señales de activación tras el reconocimiento de la molécula HLA-Cw4 (Moretta A et al 1995). Los genes codificantes para todos estos receptores fueron clonados más tarde y se confirmó su especificidad para las moléculas HLA-C y HLA-B (Colonna M et al 1995).

Desde el descubrimiento de los primeros receptores KIR inhibidores y activadores en humanos, se han identificado otros receptores KIR adicionales, de manera que actualmente, la familia de receptores KIR incluye siete receptores KIR con función inhibidora y seis con función activadora, además de KIR2DL4, que tiene una función inhibidora con potencial inhibidor. Además, el hecho de que cada gen KIR sea altamente polimórfico, y de que el producto de cada uno de los diferentes alelos de cada gen pueda interactuar más o menos fuertemente con los diferentes alelos HLA clase I, añade un mayor grado de complejidad a las interacciones entre los receptores KIR y las moléculas HLA clase I.

Por tanto, la actividad citotóxica de las células NK y T CD8+ está regulada por un conjunto de receptores y sus ligandos, entre los cuales se encuentran los receptores KIR y sus ligandos HLA de clase I (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 de células T (Van Bergen et al., 2010) y están codificados por una serie de genes localizados en una región de aproximadamente 150 kb localizada dentro del complejo de receptores leucocitarios o LRC (del inglés, *Leucocyte Receptor Complex*) en el cromosoma 19 (19q13.4) (figura 8) (Parham P. 2005).

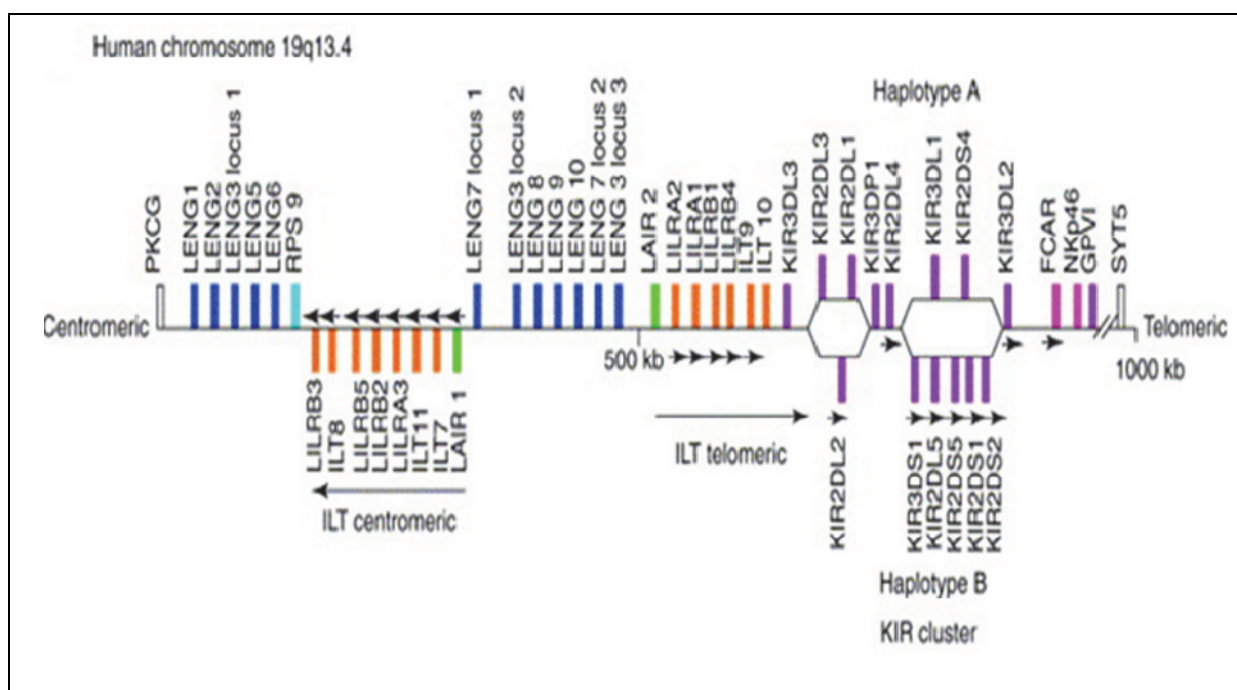


Figura 8. Localización cromosómica de los genes KIR. Los genes que codifican para los receptores KIR se localizan en el cromosoma 19 (19q13.4). *Martin AM et al 2002.*

En los receptores KIR se distinguen 3 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, D0, D1 y D2; y, en base a que estas moléculas posean 2 ó 3 dominios en la región extracelular se clasifican como KIR2D y KIR3D, respectivamente. Además, atendiendo al tipo de dominios que poseen, los receptores KIR2D se denominan 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 solamente están representados por KIR2DL4 y KIR2DL5 (Vilches et al., 2000a; 2000b) (figura 9).

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 la letra L (del inglés, *Long tail*) al final de su nombre, de manera que se denominan KIR2DL y KIR3DL (Burshtyn et al., 1999) (figura 9). En humanos se han identificado 14 receptores KIR más dos pseudogenes KIR2DP1 y KIR3DP1; de entre los receptores KIR, unos desencadenan inhibición (KIR2DL1-3, KIR2DL5, KIR3DL1-3), otros activación (KIR2DS1-5, KIR3DS1) 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).

Otros receptores tienen un tallo citoplásmico 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 9). 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 motiff*) (figura 10) implicando a las tirosín-quinazas ZAP70 y syk (Moretta et al., 1997; Vilches et al., 2002; Moretta et al., 2004).

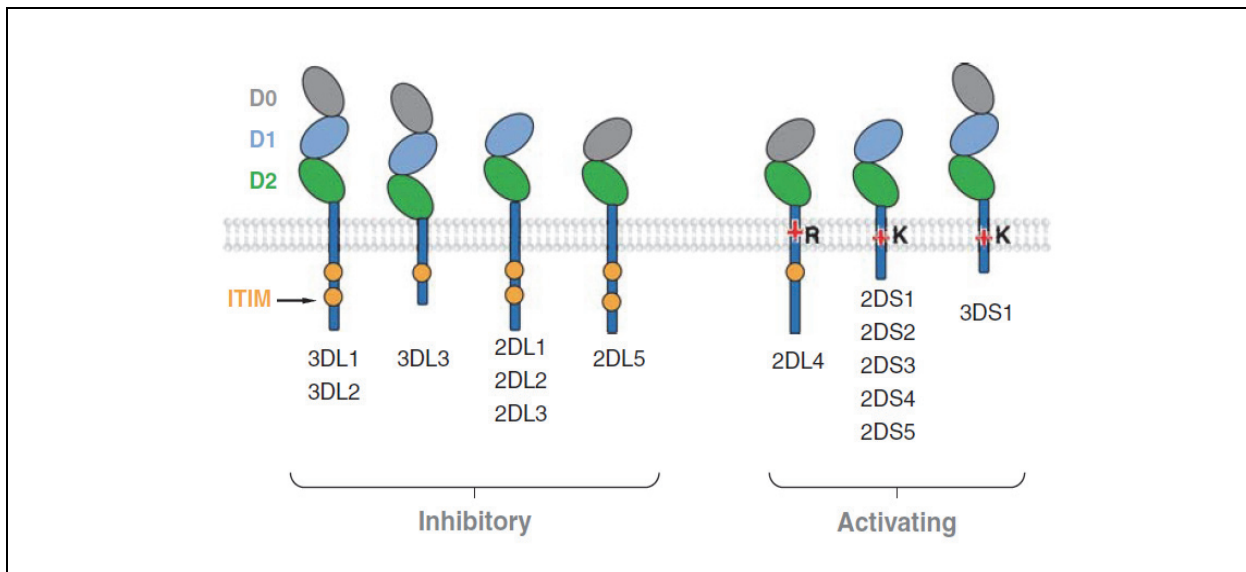


Figura 9. Estructura de los receptores KIR. Los receptores KIR pueden presentar 2 (KIR2D) o 3 (KIR3D) dominios tipo inmunoglobulina extracelulares. Además, pueden tener una región citoplásmica larga (KIR2DL, KIR3DL) o corta (KIR2DS, KIR3DS), lo que les otorga una función inhibidora o activadora de la actividad citotóxica, respectivamente. Bashirova et al. *Annual Reviews of Genomics and Human Genetics*. 2006; 7: 277-300.

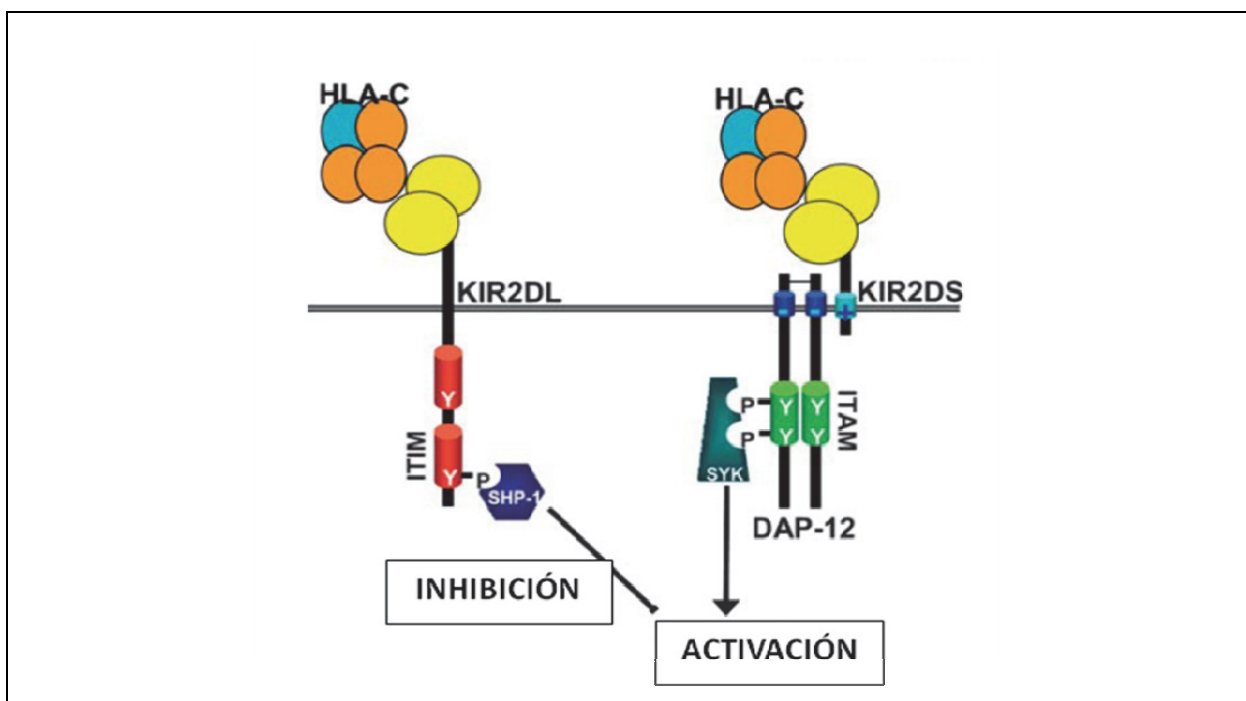


Figura 10. Función de los receptores KIR2D. La señalización intracelular a través de los receptores KIR2D difiere en base a la presencia de un tallo citoplásmico largo (KIR2DL), que media señales de inhibición, o corto (KIR2DS), que media señales de activación. Figura adaptada de Farag SS and Caligiuri MA. *Blood reviews*. 2006; 20(3): 123-37.

Los genes KIR están distribuidos uniformemente entre las regiones centroméricas y teloméricas del locus KIR. Ambas regiones tienen motivos con un contenido en genes alternativo y distintivo. La combinación de los motivos centroméricos y teloméricos A da lugar a los haplotipos KIR A, que codifican los receptores inhibidores para HLA-C1 (KIR2DL3) y HLA-C2 (KIR2DL1) en la región centromérica y los receptores inhibidores para HLA-Bw4 (KIR3DL1) y HLA A3/11 (KIR3DL2) en la región telomérica. KIR2DS4, que reconoce las moléculas HLA-A3/11 y algunas moléculas HLA-C C1 y C2, es el único receptor activador que contienen los haplotipos A (figura 11).

Los haplotipos KIR B carecen de los genes que codifican los receptores inhibidores para HLA-C2 (KIR2DL1) y HLA-Bw4 (KIR3DL1) y contienen el receptor inhibidor KIR2DL2 que reacciona con el epítipo C1. Los haplotipos KIR B se distinguen también de los haplotipos KIR A en que tienen el receptor activador KIR2DS1 y otros receptores KIR que no reconocen moléculas HLA de clase I: El receptor inhibidor KIR2DL5 y los receptores activadores KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DS1 (figura 11). Todos los haplotipos portadores de un dominio centromérico B o telomérico B, y aquellos portadores de ambos motivos centromérico B y telomérico B, se agrupan dentro de los haplotipos KIR B. La frecuencia de estos haplotipos varía entre las diferentes poblaciones humanas.

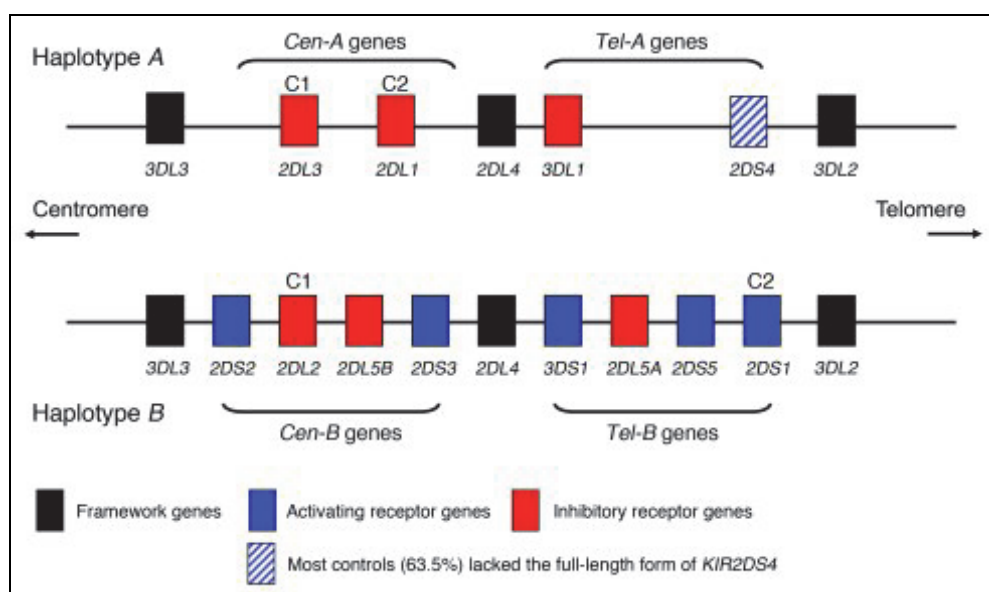


Figura 11. Los genes KIR se agrupan en haplotipos. Susan E. Hiby, Mary Carrington, Moffet A. *J Clin Invest.* 2010;120(11):4102-4110.

La expresión de los receptores KIR en células NK parece ser constitutiva (Moretta et al 1992) y estable, ya que las células NK maduras no modifican su fenotipo KIR como consecuencia de su activación “*in vitro*”, proliferación o clonaje celular (Moretta et al 1994, Moretta et al 1996), mientras que en células T es variable y puede ser inducida en ciertas condiciones. La expresión de los genes KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en células NK humanas ocurre de un modo clonal (Ciccone et al 1992), de manera que la presencia de un determinado gen KIR no significa que éste sea expresado (Torkar et al 1998; Long et al 2001).

En el caso de los linfocitos T los receptores KIR son expresados por linfocitos T CD8⁺ pero son infrecuentes en linfocitos T CD4⁺ (Mingari et al 1996). Además, el análisis de marcadores fenotípicos de células T ha revelado que las células T que expresan receptores KIR carecen de CD28, mientras que expresan altos niveles de CD18, CD29, CD57 y CD45RO (Mingari et al 1996). Estos datos, junto con la ausencia de células T KIR⁺ en timo y sangre de cordón (Mingari et al 1997) son consistentes con un fenotipo memoria e indican que se trata de células activadas “*in vivo*”.

7.2. Ligandos HLA clase-I de los receptores KIR

Los receptores KIR reconocen e interactúan con moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC 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). Éstas moléculas, también conocidas como moléculas HLA de clase I (human leukocyte antigen class-I) (Diana Torres-García et al 2008) están codificadas por genes que se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31) (figura 12).

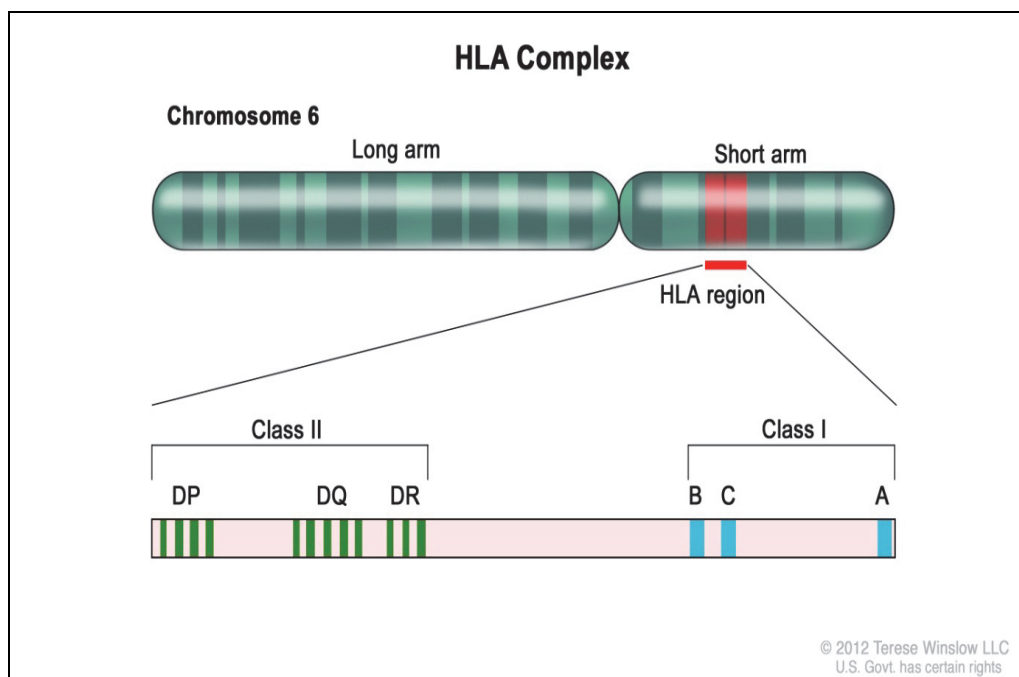


Figura 12. Localización y organización del sistema HLA en el cromosoma 6. En el brazo corto del cromosoma 6 humano se localiza el conjunto de genes que codifica a las moléculas HLA de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C, bandas azules), principales ligandos de los receptores KIR. *Childhood Hematopoietic Cell Transplantation. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2014.*

De todas las moléculas HLA de clase I, los ligandos principales de los receptores KIR son moléculas codificadas por ciertos alelos de los locus HLA-A, HLA-B, HLA-G y, fundamentalmente, las moléculas codificadas por los alelos del locus HLA-C.

En este contexto, es de destacar la presencia de un determinante antigénico, denominado epítipo HLA-Bw4, que es compartido por ciertas moléculas HLA-A y HLA-B, y que presenta un dimorfismo en la posición 80 de la α -1 hélice, en base a la presencia de un aminoácido de isoleucina (Ile) o de treonina (Thr), como se muestra en la tabla 6.

En cuanto al papel de las moléculas HLA-C como ligandos de los receptores KIR, cabe destacar que se ha descrito la existencia de un dimorfismo en la posición 80 de la α 1-hélice de las moléculas HLA-C en base a la presencia de un aminoácido de asparagina (Asn) o de lisina (Lys), que nos permite clasificar los diferentes alelos HLA-C en dos grupos de ligandos KIR denominados C1 y C2 (Colonna et al. 1993;

Mandelboim et al. 1996, Parham P 2004). 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 (excepto C*16:02), mientras que el grupo C2 (alelos HLA-C^{Lys80}) 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 (tabla 6).

Tabla 6. Dimorfismo del epítipo Bw4 y de las moléculas HLA-C.

Dimorfismo en posición 80 del Epítipo HLA-Bw4	
Aminoácido	Alelo
Ile 80	HLA-A*23, A*24, A*25, A*32, HLA-B*38, B*49, B*51, B*52, B*53, B*57, B*58, B*59, B*63
Thr 80	HLA-B*13, B*27, B*37, B*44, B*47

Dimorfismo en posición 80 de HLA-C	
Aminoácido	Alelo
Asn 80	Grupo C1: HLA-C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*14, C*16:01
Lys 80	Grupo C2: HLA-C*02, C*04, C*05, C*06, C*15, C*16:02, C*17, C*18

Estudios cristalográficos han revelado que esta posición influye en las diferencias observadas en la interacción de las moléculas HLA-C con los receptores KIR, mostrando que la naturaleza del residuo 44 en la molécula de KIR (metionina en KIR2DL1/S1 y lisina en KIR2DL2/3) es crítica para la interacción con el residuo 80 de la molécula HLA-C (Winter et al., 1998).

7.3. Interacción entre los receptores KIR y sus ligandos

Los receptores KIR2D mejor caracterizados, KIR2DL1/S1 (CD158a/h) y KIR2DL2/3/S2 (CD158b1/b2/j), reconocen moléculas HLA-C del grupo C2 (HLA-C^{Lys80}) y del grupo C1 (HLA-C^{Asn80}), respectivamente, mientras que los receptores KIR3DL1 y KIR3DL2 interaccionan con alelos HLA que presentan el epítipo HLA-Bw4 y HLA-A3/11, respectivamente (Frag and Caligiuri, 2006) (figura 13).

El aminoácido en la posición 80 de la molécula HLA-B determina críticamente la unión a KIR3DL1 (D'Andrea A et al 1995). Los alelos con el epítipo Bw6 presentan una asparagina en posición 80 y no se unen a KIR3DL1, mientras que los alelos con el epítipo Bw4, en esta posición pueden presentar una isoleucina o una treonina, y constituyen ligandos para KIR3DL1. Se ha descrito que las moléculas HLA que presentan una isoleucina 80 (Ile80) son ligandos más fuertes para KIR3DL1 que las moléculas que presentan una treonina 80 (Thr80) (Cella M et al 1994, Draghi M et al 2005).

Las moléculas KIR2DL específicas de HLA-C fueron inicialmente definidas utilizando anticuerpos monoclonales. Posteriormente, se observó que dichos anticuerpos también eran capaces de unirse a moléculas KIR2DS con dominios extracelulares de secuencia similar a KIR2DL. De este modo, se observó que KIR2DS1 reaccionaba de forma cruzada con KIR2DL1, mientras que KIR2DS2 reaccionaba de forma cruzada con KIR2DL2/3. No obstante, a pesar de las similitudes estructurales entre KIR2DS1 y KIR2DL1, se ha observado que KIR2DS1 se une débilmente a los alelos HLA-C del grupo C2 (Biassoni et al 1997; Vales-Gómez et al 1998).

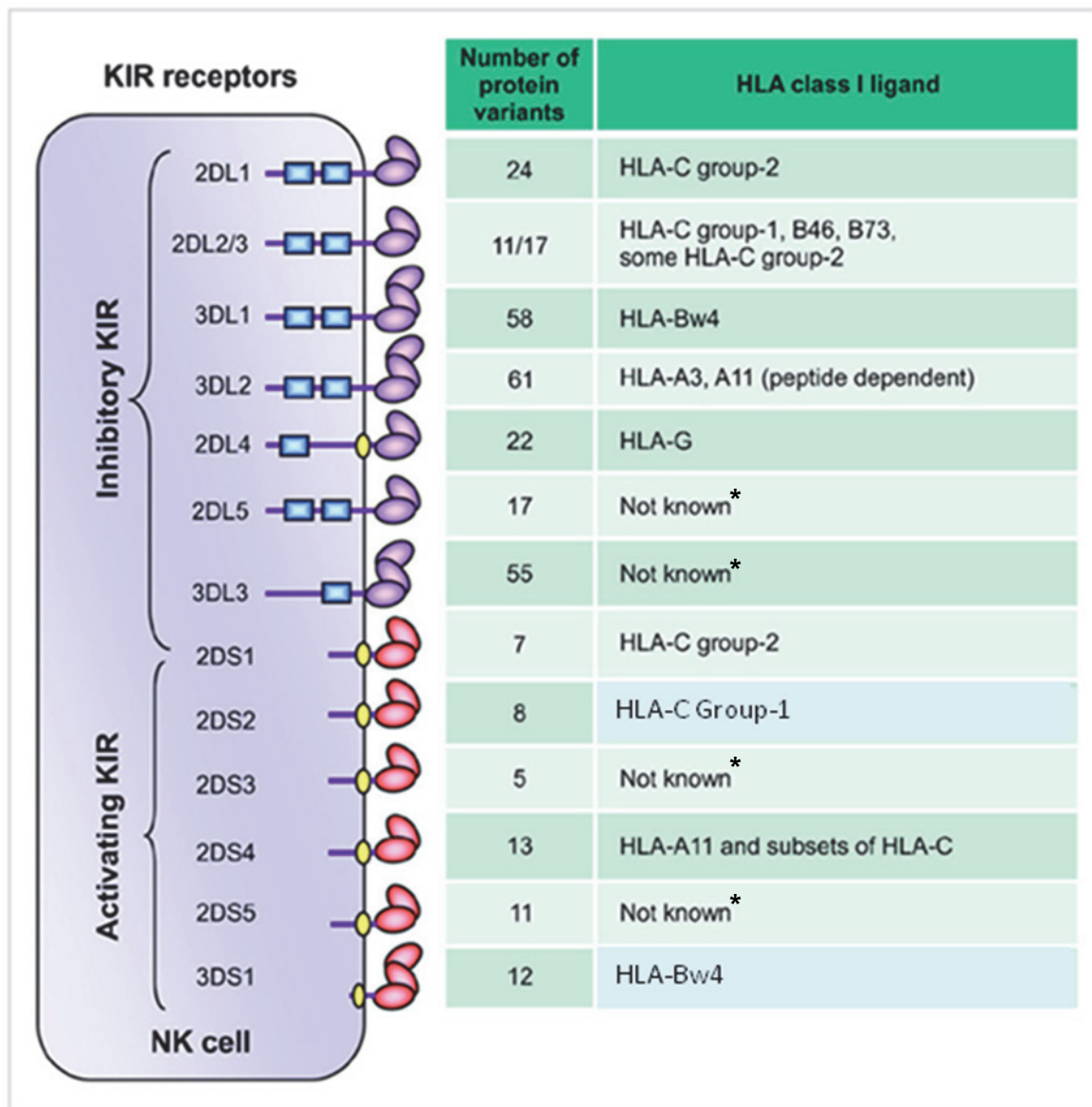


Figura 13. Receptores NK y sus correspondientes ligandos HLA de clase I. Los receptores KIR2DL1/S1 interaccionan con moléculas HLA-C2, mientras que los receptores KIR2DL2/3/S2 interaccionan con moléculas HLA-C1. El receptor KIR3DL1 interacciona con moléculas HLA de clase I que presentan el epítipo HLA-Bw4 y el receptor KIR3DL2 con las moléculas HLA-A3/11. *, Actualmente los ligandos de estos receptores son desconocidos. Figura adaptada de *Rajalingam R et al; The Korean journal of hematology. 2011; 46(4): 216-28.*

Funcionalmente, se ha demostrado que la interacción entre los receptores KIR inhibidores y sus correspondientes ligandos induce señales de inhibición que predominan sobre las señales de activación producidas por la interacción entre los receptores KIR activadores y sus ligandos, previniendo así la lisis de células diana (Parham 2004; Igarashi et al. 2004; Vitale et al. 1995; Khakoo et al. 2004 Bakker et al. 1998). Además, se ha observado que la interacción entre las moléculas HLA-C y sus correspondientes receptores KIR2DL induce señales de inhibición de diferente intensidad, las cuales vienen determinadas por la diferente afinidad entre los distintos receptores y sus correspondientes ligandos. Así, la interacción entre el receptor KIR2DL1 y las moléculas HLA-C del grupo C2 (HLA-C^{Lys80}) es más fuerte y específica que la interacción entre los receptores KIR2DL2/3 y las moléculas de HLA-C del grupo C1 (HLA-C^{Asn80}) (figura 14A). La intensidad y especificidad de ésta interacción viene definida por el dimorfismo de la molécula HLA-C en posición 80 (Asn o Lys) y el correspondiente dimorfismo en la posición 44 del dominio D1 del receptor KIR: un residuo de lisina (Lys) en KIR2DL2 y KIR2DL3, y un residuo de metionina (Met) en KIR2DL1. La variación en estas posiciones altera la fuerza y especificidad de la interacción (figura 14B).

También se ha descrito, que las interacciones más débiles y menos específicas, como la de KIR2DL2/3 con moléculas HLA-C del grupo C1, evolucionaron primero, apareciendo más tarde en el desarrollo evolutivo las interacciones más fuertes y específicas entre KIR2DL1 y las moléculas HLA-C del grupo C2 (figura 14B). No obstante, el hecho de que los alotipos C2 no hayan suplantado a los C1, ya que ambos están 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.

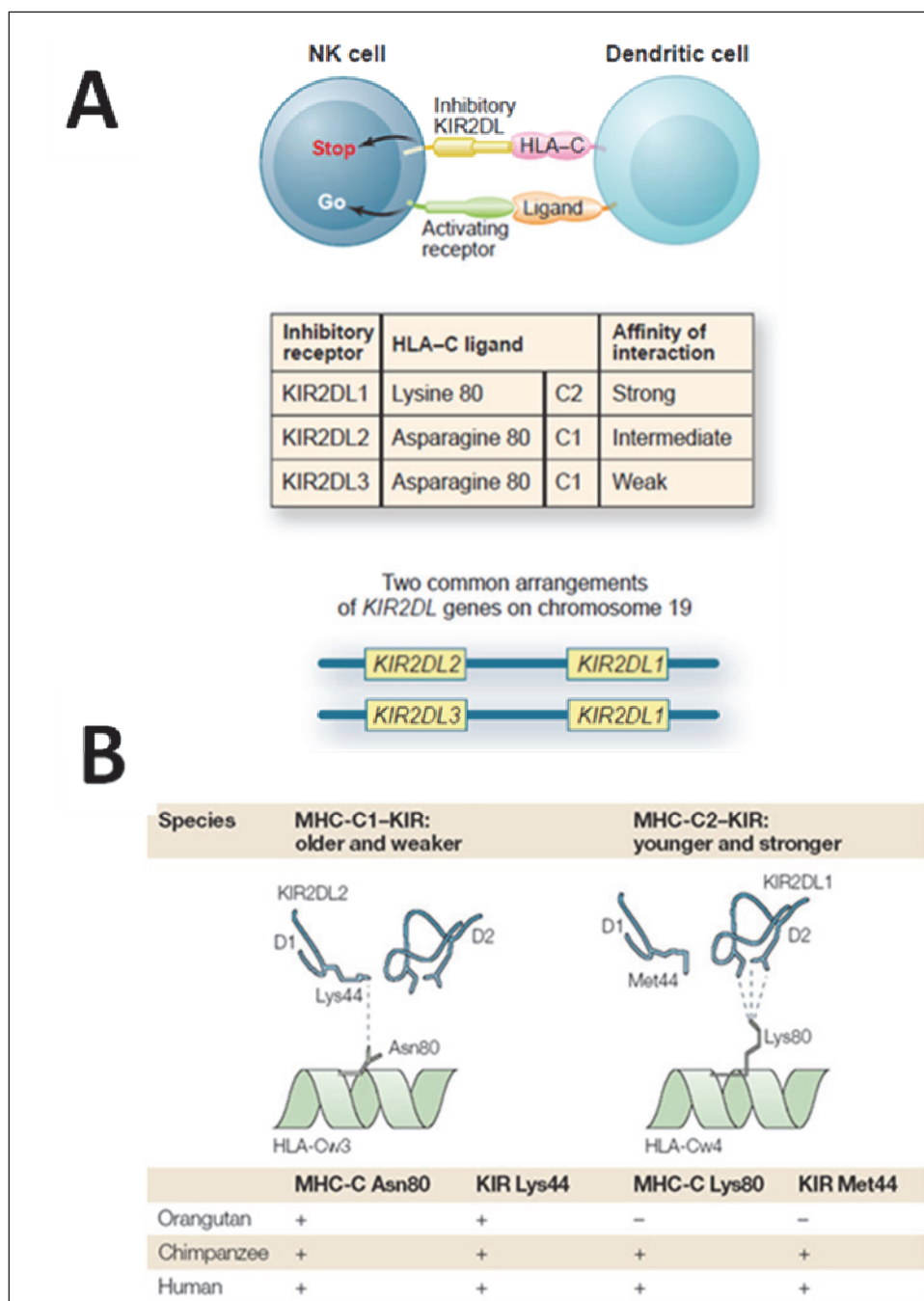


Figura 14. Afinidad de la interacción KIR2DL/HLA-C. La actividad de las células NK viene determinada por la integración de señales procedentes de receptores activadores e inhibidores como KIR2D (A). La interacción entre los alelos HLA-C2 y el receptor KIR2DL1 presenta la mayor afinidad (A). Esto es debido a la presencia de tres puentes de hidrógeno entre HLA-C2-KIR2DL1 frente a uno solo entre HLA-C1-KIR2DL2 (B). En la parte inferior de la figura A se indican los dos reordenamientos cromosómicos más comunes de los genes KIR2DL. Parham P, *Science* 2004; 305: 786-787 (A); Parham P, *Nat Rev Immunol* 2005; 5:201-214 (B).

Entre todas las interacciones posibles de las moléculas HLA-C con los receptores KIR2DL, la interacción entre las moléculas HLA del grupo C2 y KIR2DL1, es la que aporta la mayor inhibición, dando lugar a un estado de inhibición máximo en presencia de alelos HLA-C del grupo C2 en homocigosis (figura 15).

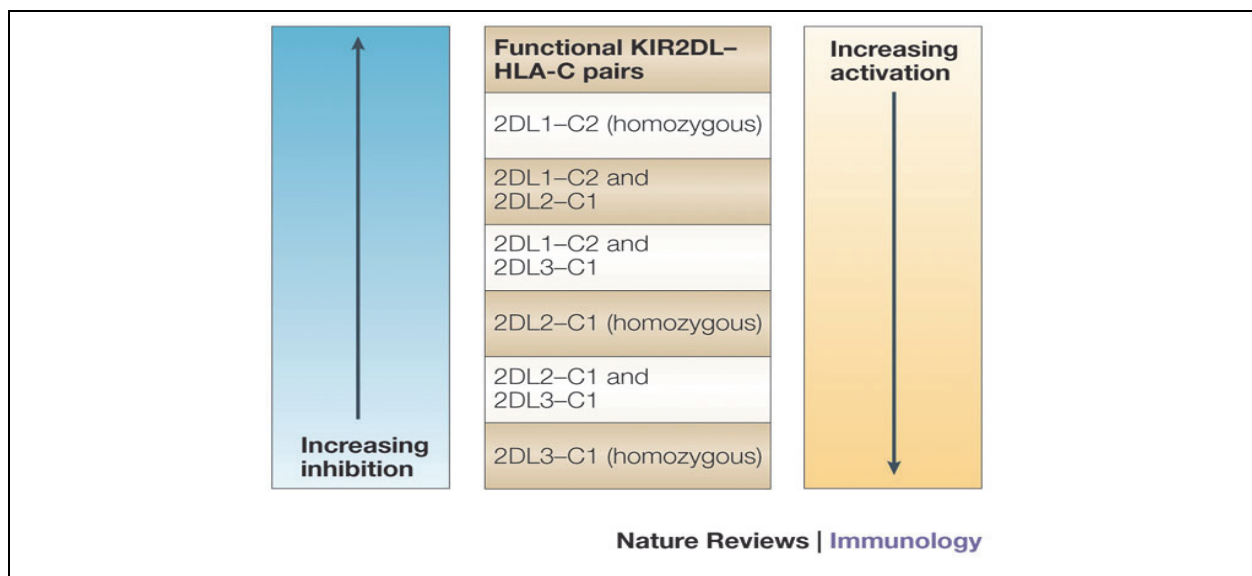


Figura 15. Jerarquía de inhibición de los receptores KIR2DL por sus ligandos HLA-C. Parham P, *Nat Rev Immunol* 2005; 5(3): 201-14.

Así pues, la interacción de KIR2DL1 con ligandos HLA del grupo C2 conduce a un estado de tolerancia en el huésped (figura 16).

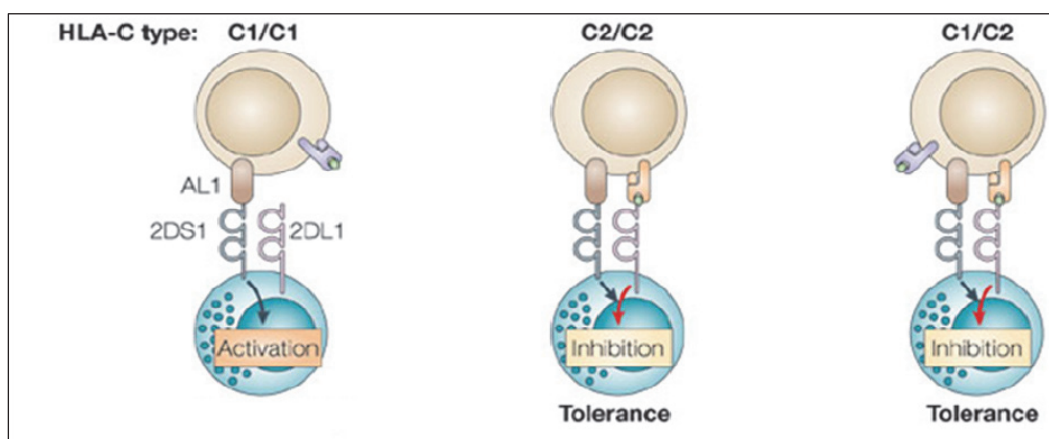


Figura 16. Modelo de inducción de tolerancia mediado por el par KIR2DL1/HLA-C2. Parham P, *Nat Rev Immunol* 2005; 5(3): 201-14.

La interacción entre los receptores KIR y sus correspondientes ligandos ha suscitado un especial interés (Bakker et al. 1998; Rajagopalan and Long 2005), debido a que la segregación independiente y el alto grado de polimorfismo descrito tanto en los receptores KIR como en las moléculas HLA clase I (Du et al. 2007; Hollenbach et al. 2012; Middleton and Gonzalez 2010), les confiere un potencial considerable como marcadores de susceptibilidad y/o progresión de la enfermedad (Parham 2005). De hecho, los receptores KIR y sus ligandos HLA clase I han sido asociados con una gran variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes (Tajik et al. 2011), infecciosas (Aranda-Romo et al. 2012) y tumorales (Al Omar et al. 2010; Martin et al. 2010; Naumova et al. 2007), y también, con la evolución del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (Pende et al. 2009; Thielens et al. 2012; Venstrom et al. 2012).

Estudiando las interacciones KIR-ligando HLA-I se han observado evidencias convincentes que indican que la interacción entre KIR2DS1 y los ligandos HLA-C del grupo C2 contribuye a la reactividad de las células NK frente a células tumorales “*in vitro*” (C.A. Stewart et al. 2005, J.H. Chewning et al. 2007; Pende et al. 2009).

Aunque las funciones biológicas de los receptores KIR activadores son mayoritariamente desconocidas, se ha descrito que el reconocimiento de los ligandos HLA-C del grupo C2 por el receptor KIR2DS1 está implicado en la actividad anti-leucémica mediada por células NK alorreactivas (S. Giebel et al. 2009; S. Verheyden et al. 2005). Además, KIR2DS1 ha sido asociado con la protección frente al linfoma de Hodgkin (C. Besson et al. 2007), y con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la artritis psoriásica y la psoriasis (F. Williams et al. 2005; S. J. Holm et al. 2005; W. Luszczek et al. 2004; Y. Suzuki et al. 2004).

En lo que respecta al melanoma, se ha observado que la lisis de células de melanoma mediada por células NK y células T CD8+ se activa a través de la expresión, en las células tumorales, de ligandos específicos para receptores activadores (Casado et al 2009), y que los receptores KIR y sus ligandos HLA de clase I están implicados en la inhibición de la misma (Bakker et al 1998; Carrega et al 2009). No obstante, debe tenerse en cuenta que la expresión de HLA de clase I se encuentra a menudo disminuida en células de melanoma (Garrido et al. 1997), de manera que cuando las señales inhibitoras desaparecen (Pende et al. 1998), la

expresión en las células tumorales de ligandos para receptores activadores de células NK puede hacerlas más susceptibles a la lisis por células T CD8 y NK (Moretta et al. 2001).

En este contexto, es de destacar que aunque el melanoma es considerado uno de los tumores más inmunogénicos (Anichini et al. 2004; Lee et al. 1999), puede eludir la vigilancia del sistema inmune, específicamente si se induce un estado de tolerancia (Chouaib et al. 2002). En esta línea, recientemente se ha demostrado que los receptores KIR podrían comportarse como biomarcadores inmunológicos de supresión de la función de las células NK y tolerancia en pacientes de melanoma (Konjevic et al. 2009).

En definitiva, el descubrimiento de los receptores KIR en células NK y células T, así como la regulación que ejercen sobre la actividad citotóxica de las mismas (Farag and Caligiuri 2006; Mingari et al. 1998), ha abierto nuevas fronteras en la inmunología y ha llevado a una mejor comprensión de los mecanismos que están implicados en la inmunoregulación o que pueden interferir en el control de las infecciones o del crecimiento tumoral, pudiendo tener una importante aplicación en la inmunoterapia del cáncer.

7.4. Receptores tipo lectina-C

Un segundo tipo de receptores de células NK son los receptores heterodiméricos de la familia de las lectinas tipo-C que incluye receptores como NKG2A y NKG2C, entre otros. Estos receptores están compuestos por dos subunidades, una subunidad CD94 y una molécula de la familia NKG2 unida covalentemente a CD94 (Lanier LL 1998). Por su parte, NKG2D es un receptor con un dominio tipo lectina homodimérico que no se asocia a CD94 (Moretta L et al. 2006) (figura17).

La molécula CD94 carece de dominio citoplasmático para mediar la señal de transducción intracelular, por lo que su especificidad funcional viene determinada por las moléculas NKG2 (NKG2A, NKG2C), pertenecientes a la familia de las lectinas tipo-C.

Por lo que respecta a su especificidad, los heterodímeros CD94/NKG2 se unen específicamente a la molécula no clásica HLA-E (Lee et al. 1998). De forma similar a los receptores KIR, 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 de los receptores activadores, como NKG2C, tienen tallos citoplasmáticos cortos asociados a la proteína adaptadora DAP12, que presenta motivos ITAM mediadores de señales de activación. Sin embargo, el receptor NKG2D, a diferencia del resto de receptores NKG2 activadores, se asocia con la proteína adaptadora DAP10 (Andre P et al 2004), como se muestra en la figura 17. Las células citotóxicas expresan una amplia gama de receptores de activación entre los que se incluye el receptor NKG2D y NKG2C (Moretta A et al. 2001) a los que se opone la señalización mediada por receptores inhibidores como CD94/NKG2A (Braud et al. 1998; O'Callaghan CA 2000) (figura 17).

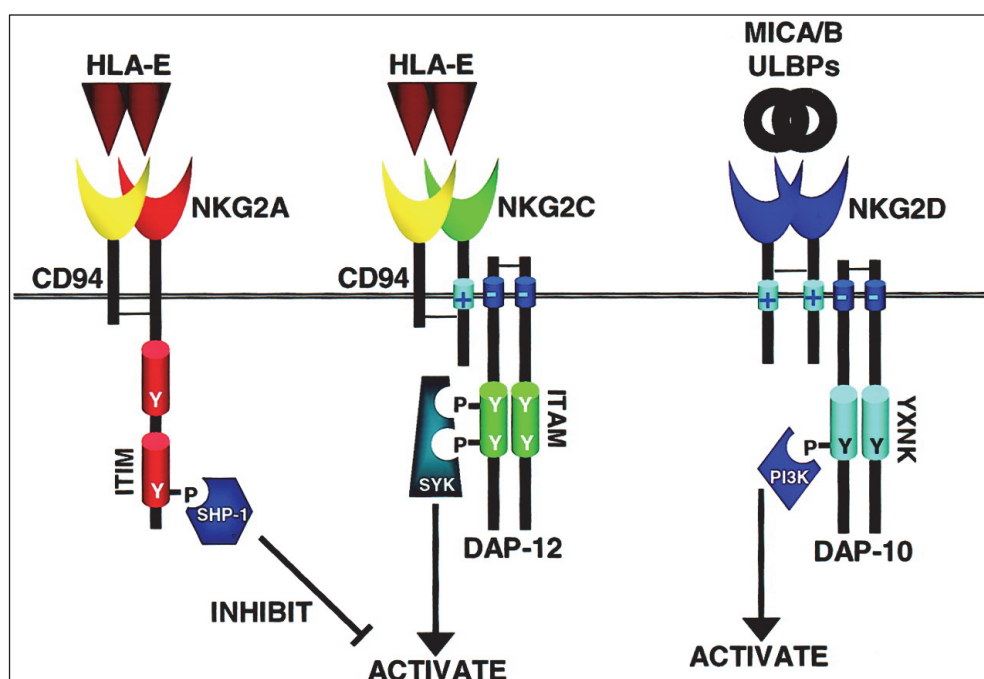


Figura 17. Receptores NK de la familia de las lectinas tipo-C. Se representan los receptores heterodiméricos NKG2A (función inhibitoria) y NKG2C (función activadora), ambos asociados a la molécula CD94, y el receptor homodimérico NKG2D (función activadora). *Farag SS et al. Blood. 2000; 100: 1935-47.*

Se ha descrito que el reconocimiento y la lisis de células de melanoma son procesos controlados por múltiples interacciones entre receptores activadores y sus ligandos (Morgado et al. 2011; Carrega et al. 2009; Pende et al. 2001) (figura 18), entre las que se encuentran las interacciones entre receptores activadores como NKp46, NKp30 y NKp44 con sus ligandos, NKG2D con sus ligandos MICA/B y ULBPs y DNAM-1 con sus ligandos PVR y Nectina-2, siendo la interacción entre NKG2D y sus ligandos una de las principales y más polimórficas entidades responsables de la lisis de células de melanoma (Morgado et al 2011).

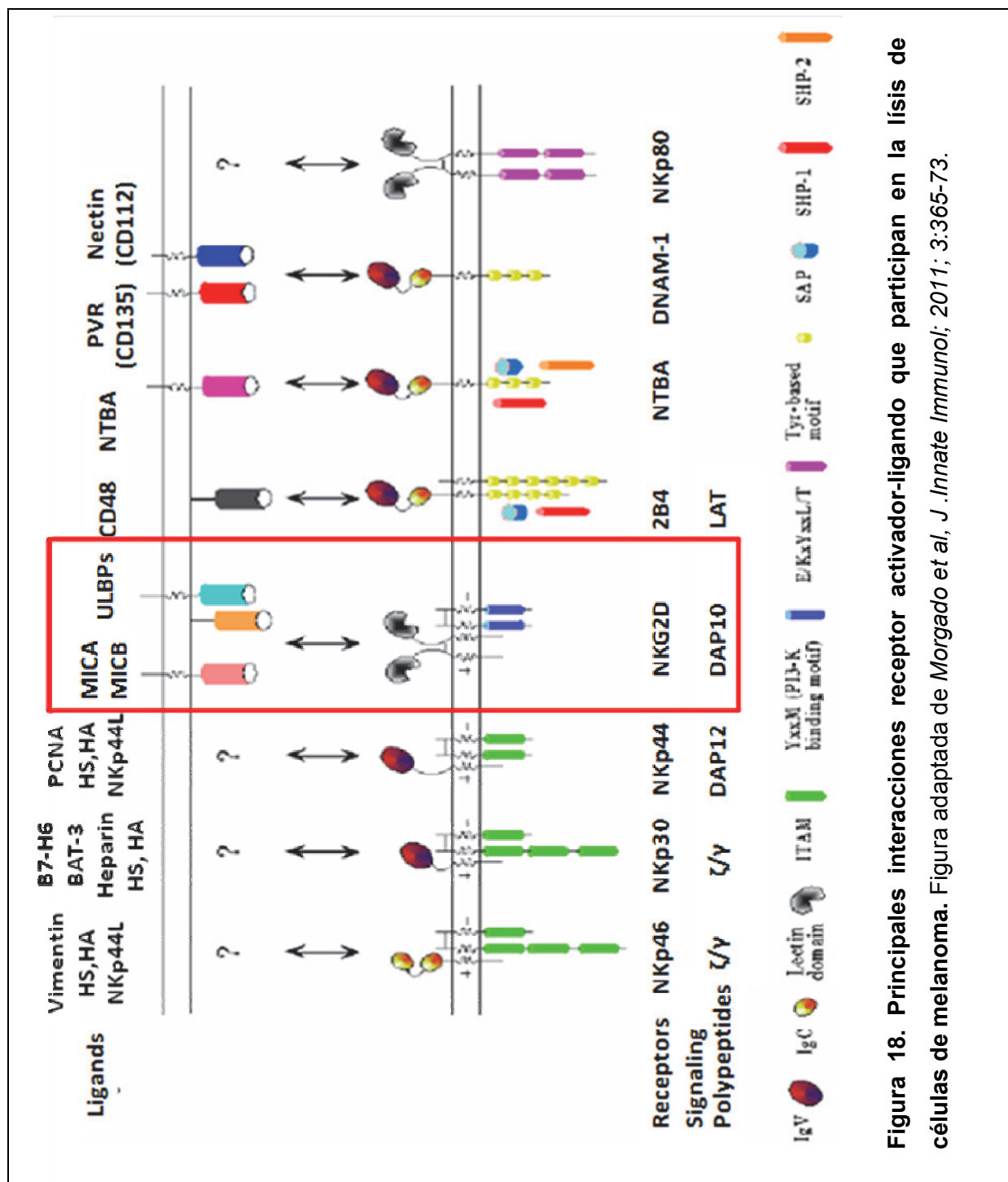


Figura 18. Principales interacciones receptor activador-ligando que participan en la lisis de células de melanoma. Figura adaptada de Morgado et al, *J. Innate Immunol*; 2011; 3:365-73.

7.5. Receptor NKG2D

NKG2D es una molécula de la familia de las lectinas de tipo C. Las lectinas de tipo C son moléculas que se unen a carbohidratos a través de un motivo estructural común y de una manera dependiente de Ca^{2+} , sin embargo, NKG2D no tiene características que sugieran que se una a carbohidratos. Estructuralmente, NKG2D es una glicoproteína transmembrana homodimérica de tipo II, codificada en el cromosoma 12 humano, dentro del complejo de genes natural killer (NKC) (Coudert et al 2006) (figura 19).

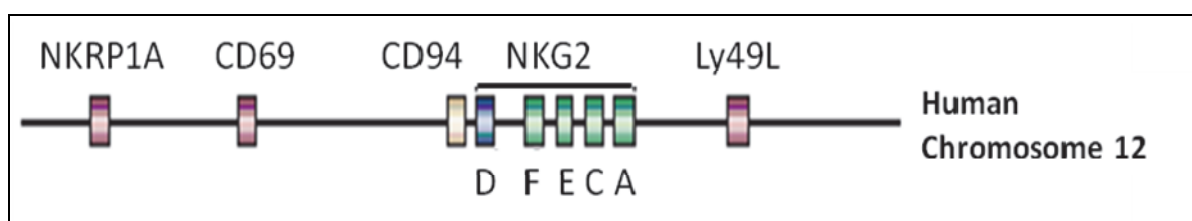


Figura 19. Localización cromosómica del gen NKG2D. Figura adaptada de Coudert JD, Held W. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16(5): 333–43.

NKG2D se expresa en la superficie de células NK, células T $\text{CD8}^+\text{TCR-}\alpha\beta$ y células T $\text{TCR-}\gamma\delta$ y se asocia con DAP10, una molécula adaptadora que carece de motivo ITAM y que en su lugar presenta un motivo YXNK de unión al dominio de homología Src 2 (SH2) (figura 17).

La unión de NKG2D a su ligando desencadena la fosforilación de DAP10 por quinasas de la familia Src con el consecuente reclutamiento de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-quinasa, lo cual, en última instancia, conduce a la activación celular. (Upshaw JL et al 2006, Wu J et al 1999).

Se ha observado que la señalización mediada por NKG2D a través de DAP10 es suficiente para activar la citotoxicidad celular (Upshaw JL et al 2006), aunque esto varía dependiendo del tipo de célula. En las células NK de ratón, NKG2D puede asociarse con las moléculas adaptadoras DAP10 y DAP12. Ambas vías de señalización desencadenan la activación de la citotoxicidad celular, pero sólo la vía a través de DAP12 da como resultado la inducción de la producción de citoquinas. En humanos, NKG2D se asocia sólo con DAP10 y su estimulación desencadena la citotoxicidad pero no la secreción de citoquinas. Sin embargo, en las células T CD8⁺ de ambas especies, NKG2D se asocia sólo con DAP10 y su activación desencadena la coestimulación pero no la activación de la citotoxicidad celular (Trinchieri et al 2003) (figura 20).

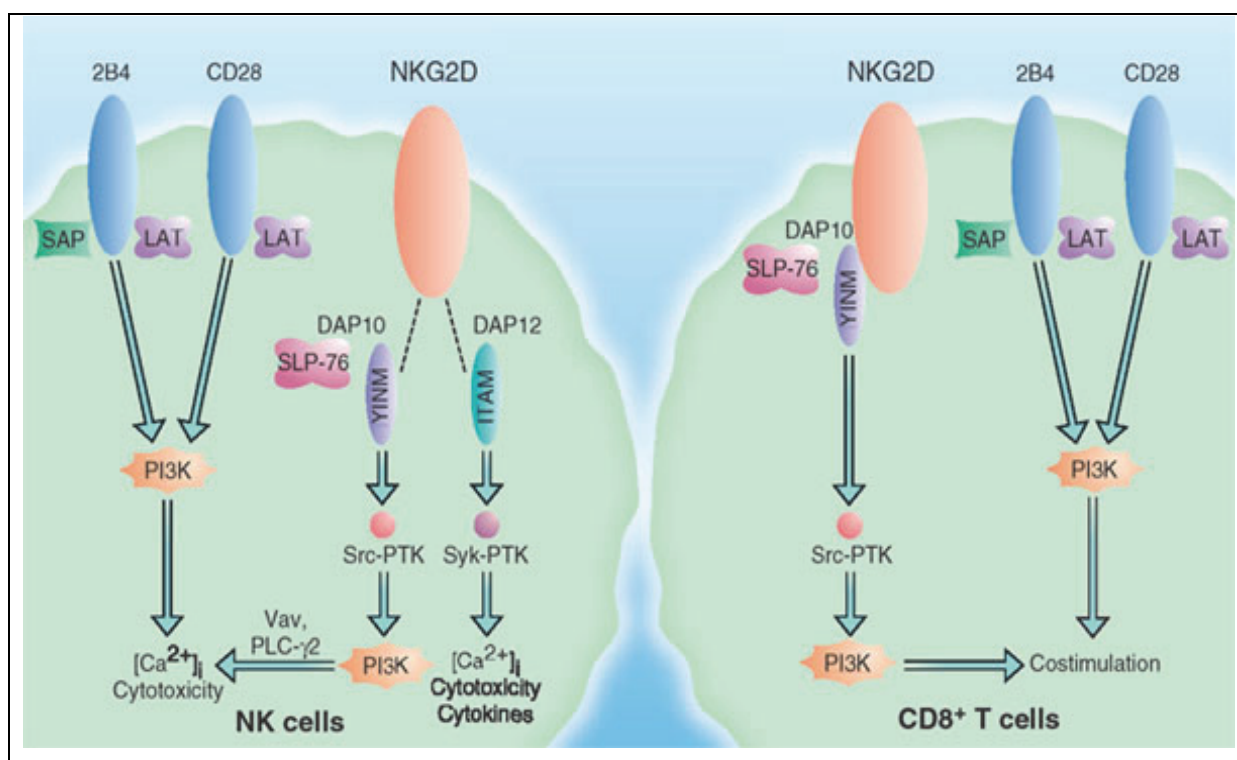


Figura 20. NKG2D actúa como un receptor activador en células NK y coestimulador en células T CD8⁺. Trinchieri et al. *Nature immunology*. 2003; 4:509-510.

Se ha observado que la disminución de la expresión de NKG2D puede ser consecuencia del aumento de citoquinas inmunosupresoras como TGF- β (Lee KM et al. 2004, Eagle RA et al. 2007), de una estimulación continuada de NKG2D por sus ligandos expresados en células tumorales, lo que causaría la disfunción del receptor y la anergia de las células NK por reducción de la molécula DAP10 (Coudert JD et al. 2006), o bien por la existencia de ligandos MICA solubles derivados del tumor que tras la unión al receptor NKG2D bloquean su activación (Groh V et al. 2002). Además, recientemente se ha descrito, en algunos melanomas humanos, que los ligandos MICA son retenidos intracelularmente y degradados por la actividad de los proteasomas en el citoplasma, lo que produce una disminución de la expresión de NKG2D en células NK y la resistencia de los melanocitos a la citotoxicidad mediada por dichas células (Fuertes MB et al. 2008). Además, se ha visto una disminución de la expresión de NKG2D en pacientes con melanoma metastásico en estadio IV en comparación con pacientes en los estadios I, II y III, que se correlaciona con una reducción en la capacidad citotóxica de las células NK (Martinovic et al. 2010). También se ha observado una disminución de la expresión del receptor NKG2D en células NK de individuos con otros tipos de cáncer, como cáncer colorrectal (Yajuan Shen et al. 2012) y carcinoma hepático (Zhang C et al. 2005). Además,

7.6. Polimorfismo del receptor NKG2D

El polimorfismo del receptor NKG2D ha sido asociado con la actividad citotóxica de las células NK en una población de origen japoneses (Hayashi et al 2006). En este estudio, los autores analizaron 20 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de una región génica de 270 kb localizada dentro del complejo natural killer (NKC) 12p13.2-p12.3. Esta región contiene genes importantes que codifican receptores NK, como el gen CD94 o la familia de genes de receptores lectina tipo C de las células NK (Borrego F et al 2002). Ocho de los 20 SNPs estudiados, (NKC-3, NKC-4, NKC-7, NKC-9, NKC-10, NKC-11, NKC-12 y NKC-17), se asocian fuertemente con la actividad citotóxica de las células NK. De estos ocho SNP, los siete primeros están localizados en la región génica de NKG2D mientras que NKC-17 se localiza en la región promotora del gen NKG2A (figura 21). Además, también se ha descrito la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento entre algunos de

estos ocho SNPs citados anteriormente. Esto ha permitido definir dos bloques de SNPs constituidos por 2 haplotipos (LNK y HNK) asociados con una actividad citotóxica natural baja o alta, así como con un riesgo incrementado o disminuído de desarrollar cáncer, respectivamente (Hayashi et al. 2006).

En cuanto al papel del polimorfismo de NKG2D en distintas enfermedades, se ha observado que tiene un impacto significativo en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de donante HLA-compatible no relacionado (Espinoza JL et al. 2009), en el desarrollo de colangiocarcinoma en pacientes con colangitis esclerosante primaria (Melum E et al. 2008), en el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en la población Japonesa (Furue H et al. 2008), y en la susceptibilidad a desarrollar carcinoma cervical (Roszak A et al. 2012) y cáncer de pulmón (Ghobadzadeh S et al. 2013). Además, también ha sido asociado con la susceptibilidad a desarrollar de hepatitis B crónica (Ma J et al. 2010) y con la protección a desarrollar de lupus eritematoso sistémico (LES) (Piotrowski P et al. 2010).

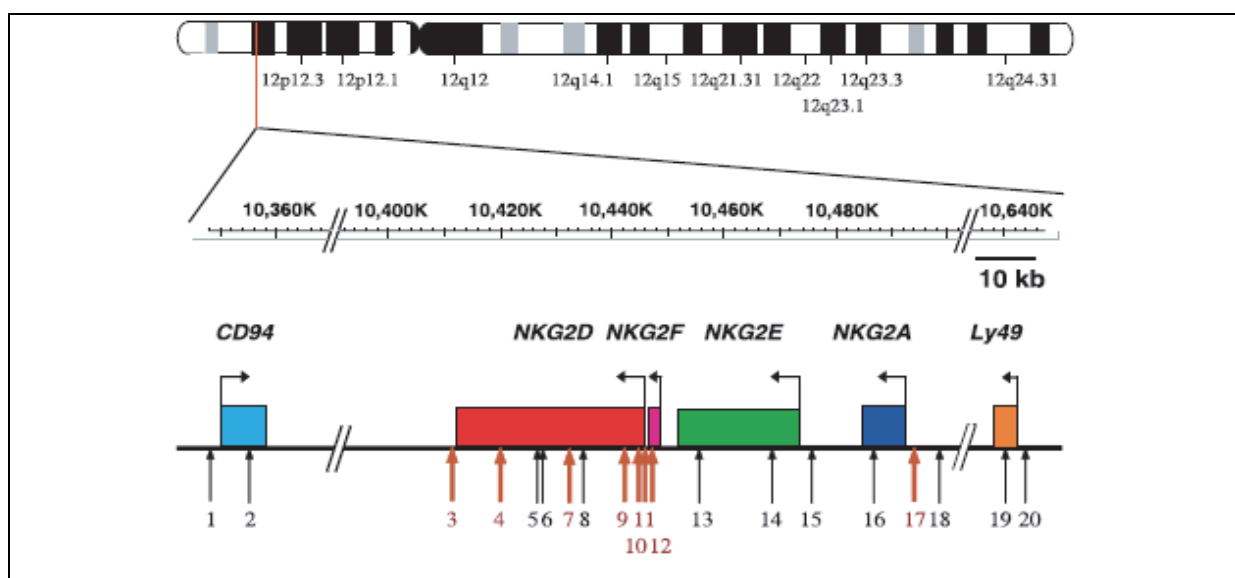


Figura 21. SNPs de la región NKC asociados con actividad citotóxica. En la figura se muestran 20 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) (señalados con flechas) localizados dentro de la región génica NKC en el cromosoma 12. Ocho de estos SNPs (flechas naranjas) han sido asociados con variaciones en la actividad citotóxica en la población Japonesa. *Hayashi et al. Cancer research. 2006; 66(1): 563-70.*

7.7. Ligandos MICA del receptor NKG2D

Los ligandos del receptor NKG2D en humanos incluyen las moléculas MIC y las moléculas de unión a UL16 (Bauer et al 1999; Kasahara et al 2012; Raulet et al 2003; Steinle et al 2001). Los genes que codifican para las proteínas MIC se localizan en el cromosoma 6 e incluyen siete miembros (MICA-MICG) (figura 22), dos de los cuales (MICA y MICB) son genes funcionales estrechamente relacionados entre sí, mientras que los cinco restantes son pseudogenes (Kasahara et al 2012).

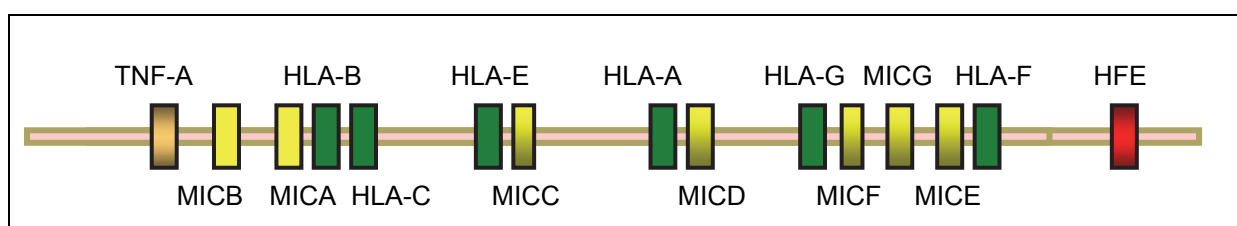


Figura 22. Distribución de los genes MIC en el cromosoma 6. Se representa la localización de los genes MIC en el cromosoma 6 (recuadros amarillos), junto a los genes HLA (recuadros verdes), gen del TNF-A (recuadro marrón) y el gen HFE (recuadro rojo).

A diferencia de los genes HLA de clase I clásicos, los genes MICA y MICB codifican para moléculas de superficie celular cuya expresión es inducida por estrés, no se asocian con beta 2-microglobulina, y no parecen presentar péptidos (Grubic, Z et al. 2006). Además, las proteínas MICA y MICB tienen una distribución tisular limitada (Zwirner et al 1998), ya que se expresan principalmente en el epitelio gastrointestinal, queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos, aloinjerto renal y de páncreas, y en lesiones y líneas celulares derivadas de tumores epiteliales y de melanoma cutáneo (Casado et al 2009; Vetter et al 2002; Fuertes et al 2011).

El gen MICA se encuentra en la región de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I, a unas 46 kb en dirección centromérica respecto al locus HLA-B, y es, con diferencia, el gen MIC más polimórfico conocido en mamíferos (Bahram et al 1994). Muestra un alto grado de polimorfismo alélico en el exón 5 que codifica para la región transmembrana de la molécula (Mizuki et al 1999), así como en los exones 2, 3 y 4 que codifican para los tres dominios extracelulares alfa-1, alfa-2 y alfa-3 de la proteína MICA, respectivamente (Petersdorf et al 1999).

Aunque el significado funcional de la diversidad del gen MICA es desconocido, ciertos cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína MICA pueden influir en la afinidad por su receptor NKG2D (Steinle et al 2001). En este sentido, se ha demostrado que la presencia de un residuo de metionina (Met) o valina (Val) en el codón 129 del dominio extracelular alfa-2 de la proteína puede conferir una afinidad fuerte o débil por NKG2D, respectivamente (tabla 7).

Tabla 7. Alelos MICA según el dimorfismo en el codón 129 del dominio extracelular alfa-2 de la proteína.

Met 129 (Alta afinidad por NKG2D)			Val 129 (Baja afinidad por NKG2D)		
MICA*001	MICA*031	MICA*051	MICA*003	MICA*028	MICA*070
MICA*002	MICA*032	MICA*052	MICA*004	MICA*033	MICA*071
MICA*007	MICA*034	MICA*053	MICA*005	MICA*044	MICA*074
MICA*011	MICA*035	MICA*057	MICA*006	MICA*048	MICA*075
MICA*012	MICA*036	MICA*058	MICA*008	MICA*049	MICA*076
MICA*014	MICA*037	MICA*060	MICA*009	MICA*054	MICA*077
MICA*015	MICA*038	MICA*065	MICA*010	MICA*055	MICA*078
MICA*017	MICA*039	MICA*067	MICA*013	MICA*056	MICA*079
MICA*018	MICA*040	MICA*072	MICA*016	MICA*059	MICA*080
MICA*020	MICA*041	MICA*073	MICA*019	MICA*066	MICA*083
MICA*021	MICA*042	MICA*081	MICA*022	MICA*068	MICA*084
MICA*023	MICA*043	MICA*082	MICA*024	MICA*069	MICA*087
MICA*025	MICA*045	MICA*086	MICA*027		
MICA*026	MICA*046				
MICA*029	MICA*047				
MICA*030	MICA*050				

Recientemente se ha descrito que niveles bajos de expresión de los ligandos MICA-129Val (baja afinidad) en las células diana produce una menor degranulación y liberación de IFN- γ por parte de las células NK que los ligandos MICA-129Met (alta afinidad), tras la interacción con el receptor NKG2D. Sin embargo, a medida que los niveles de expresión de los ligandos MICA-129Val aumentan se produce un aumento paralelo en la degranulación y producción de IFN- γ por las células NK, mientras que el aumento en la expresión de los ligandos MICA-129Met induce una rápida disminución en la expresión del receptor NKG2D en células NK, que tiene un efecto negativo en la activación de las mismas (Isernhagen A, 2016b) (figura 23A). En linfocitos T CD8⁺, se ha descrito que niveles bajos de expresión de los ligandos MICA-129Val en las células diana o en las células presentadoras de antígeno (APCs) producen una coestimulación dependiente de antígeno más tardía que los ligandos MICA-129Met tras la interacción con el receptor NKG2D. Sin embargo, a medida que los niveles de expresión de los ligandos MICA-129Val aumentan se produce una mayor coestimulación de las células T CD8⁺, mientras que el aumento en la expresión de los ligandos MICA-129Met induce una rápida disminución de la expresión del receptor NKG2D en células T CD8⁺, que tiene un efecto negativo en la coestimulación de las mismas (Isernhagen A, 2016b) (figura 23B). Por tanto, el efecto biológico del dimorfismo MICA-129Met/Val varía con la intensidad de expresión de las moléculas MICA en la membrana de las células diana y/o APCs.

También se ha descrito, en ensayos *in vitro* con líneas celulares de melanoma, que el dimorfismo MICA-129Met/Val afecta a la densidad de expresión de MICA en la membrana plasmática, de manera que la variante MICA-129Met es retenida intracelularmente en mayor proporción que la variante MICA-129Val. Además, se ha observado que la variante MICA-129Met es más susceptible de ser liberada de la membrana plásmática que la variante MICA-129Val. Ambos procesos parecen limitar la expresión en la superficie celular de los ligandos MICA-129Met, ligandos que tienen una gran avidéz de unión a NKG2D (Isernhagen A, 2016a).

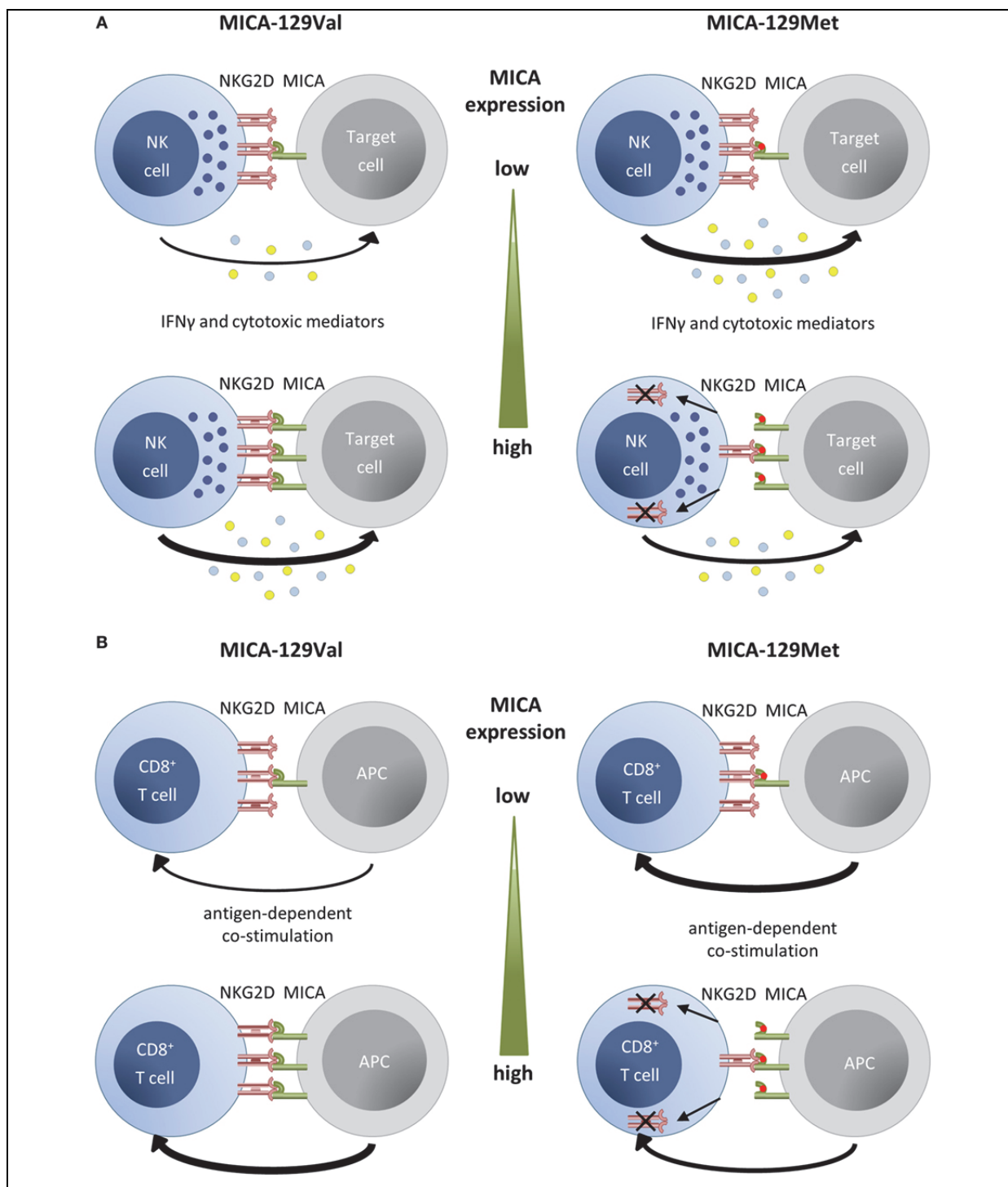


Figura 23. Los efectos funcionales del dimorfismo MICA-129 dependen de la intensidad de expresión de MICA en las células diana y/o APCs. Efecto del dimorfismo MICA-129 y de la expresión de MICA en la activación, coestimulación y función efectora de: (A), células NK; (B), linfocitos T CD8⁺. *Isernhagen A, Front immunol. 2016b; 7:588.*

El polimorfismo del gen MICA se ha asociado con una amplia gama de enfermedades (Choy et al 2010), incluyendo enfermedades autoinmunes e inflamatorias (López-Hernández et al 2010; Mizuki et al 2007), enfermedades infecciosas y tumorales (García et al 2011; Vallian et al 2012), rechazo de aloinjertos y enfermedad de injerto contra huésped (Boukouaci et al 2009). En lo que respecta al melanoma, hasta la fecha, se ha llevado a cabo un número limitado de estudios sobre el polimorfismo en la región transmembrana del gen MICA, sin embargo, no se han realizado estudios sobre la influencia del polimorfismo en los dominios extracelulares del mismo (Kennedy et al 2002; Metzelaar-Blok et al 2005).

Por otra parte, es conocido que los ligandos de NKG2D expresados en las células tumorales activan la respuesta citotóxica de células NK y linfocitos T gamma/delta, y coestimulan la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ (Bauer S et al 1999; Das H et al 2001; Rincón-Orozco B et al 2005). Sin embargo, muchos tipos de células tumorales liberan dichos ligandos mediante diversos mecanismos como el “Splicing” alternativo, la rotura mediada por PI-PLC, la escisión proteolítica, o la secreción en exosomas (figura 24). Así, los ligandos de NKG2D ULBP2/4/5 pueden ser liberados por rotura proteolítica mediante la acción de las proteasas ADAM, mientras que los ligandos ULBLP 1/2/3 pueden ser liberados mediante secreción en exosomas, y los ligandos anclados a GPI, como ULBP 1/2/3 y presumiblemente ULBP 6 pueden ser también liberados de la superficie celular por PI-PLC. Además, los ligandos MICA y MICB pueden ser liberados de la membrana celular mediante la acción de las proteasas ADAM y mediante la secreción en exosomas (figura 24, parte izquierda). Todos estos mecanismos, probablemente debido al efecto inhibitor que ejercen dichos ligandos solubles al unirse al receptor NKG2D (figura 24, parte derecha), pueden facilitar la evasión del tumor frente al ataque del sistema inmunitario.

Específicamente, se ha encontrado que MICA (Salih HR et al 2002; Groh V et al 2002), MICB (Salih HR et al 2006, Boutet P et al 2009), ULBP1 (Song H et al 2006), ULBP2 (Waldhauer I et al 2006; Fernandez-Messina L et al 2010), ULBP3 (Fernandez-Messina L et al 2010), ULBP4 (Cao W et al 2007), RAET1E, y ULBP5/RAET1G (Bacon L et al 2004), pueden ser solubilizados mediante los mecanismos antes indicados.

Respecto al papel de los ligandos solubles de NKG2D en el desarrollo de enfermedades tumorales, hay que destacar que se ha encontrado niveles aumentados de dichos ligandos en el suero de pacientes con cáncer, así como una correlación entre dichos niveles y la estratificación clínica o el pronóstico del mismo. En el caso del melanoma, se han observado niveles significativamente aumentados de MICA y ULBP2 solubles en el suero de pacientes con la enfermedad. Así mismo, también se ha descrito una correlación entre el aumento de los niveles de ULBP2 soluble en suero y los estadios clínicos de progresión del melanoma y la carga tumoral (Annette Paschen et al 2009).

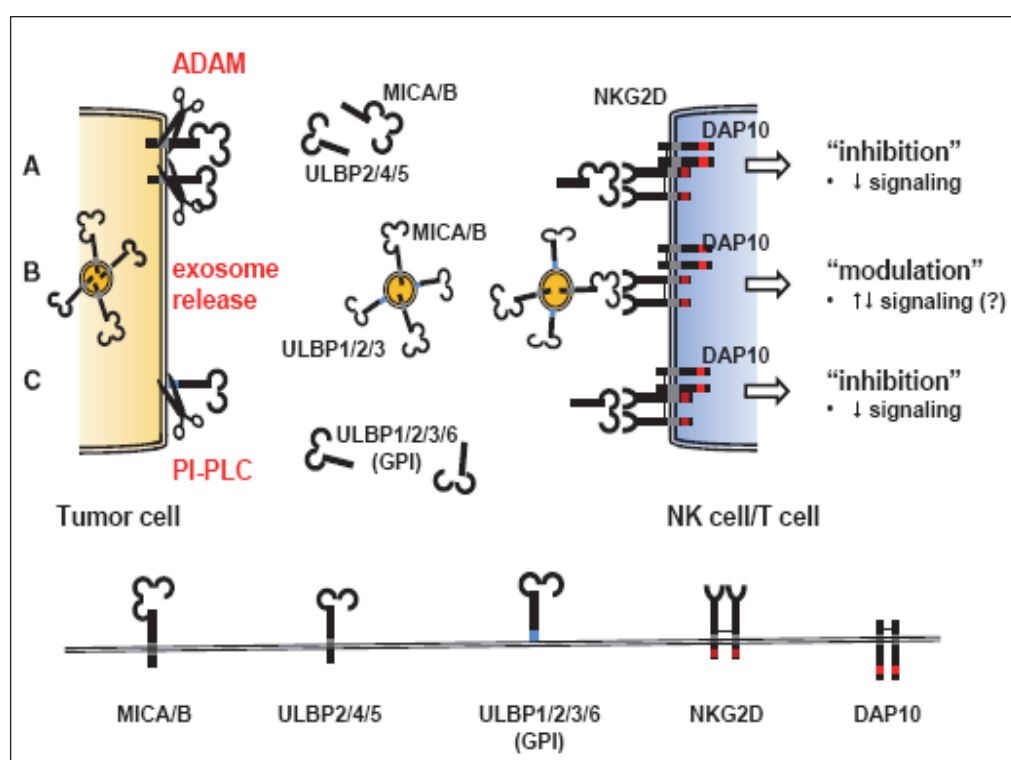


Figura 24. Los ligandos de NKG2D pueden ser liberados a través de diferentes rutas.

(A) ADAM genera ligandos de NKG2D solubles que se unen a NKG2D bloqueando su activación. (B) Los ligandos de NKG2D asociados a membrana pueden ser secretados en exosomas. La unión de los exosomas que contienen ligandos de NKG2D interfiere con la señalización a través de NKG2D y puede bloquear o activar directamente a NKG2D. (C) Las ULBPs ancladas a GPI pueden ser liberadas de la membrana celular por PI-PLC, estas ULBPs solubles pueden unirse a NKG2D y bloquear su señalización. Algunos ligandos de NKG2D (ULBP4/5) también pueden ser secretados por corte y empalme alternativo (splicing alternativo). Chitadze G et al, *Scandinavian Journal of Immunology*, 2013, 78, 120–129.

HIPÓTESIS Y **OBJETIVOS**

HIPÓTESIS

El melanoma cutáneo es uno de los tumores más inmunogénicos que se conocen, sin embargo, y a pesar de inducir la activación de una respuesta del sistema inmunitario frente al mismo, este presenta una evolución clínica impredecible que podría estar influenciada por variaciones genéticas interindividuales de moléculas que participan en la respuesta inmunitaria antitumoral. Entre las moléculas que intervienen en la respuesta inmunitaria antitumoral, se encuentran las moléculas HLA de clase-I y MICA, que actúan como ligandos de los receptores KIR y NKG2D, respectivamente, capaces de modular la actividad citotóxica de las células NK y los linfocitos T CD8⁺.

Actualmente, está bien establecido que la actividad citotóxica de las células NK y los linfocitos T CD8⁺ esta regulada a través del balance entre señales de activación y de inhibición, que podrían determinar, en última instancia, la eliminación de las células tumorales o el escape de las mismas a la acción del sistema inmunitario. Además, los receptores KIR y NKG2D y sus ligandos HLA-I y MICA, respectivamente, presentan un alto grado de polimorfismo en la población, lo que les confiere una potencial utilidad como biomarcadores de susceptibilidad y/o pronóstico en distintas patologías.

Por todo ello, en el presente trabajo nos hemos planteado investigar el polimorfismo de los receptores KIR y NKG2D, y de sus ligandos HLA-I y MICA en pacientes con melanoma, así como estudiar la expresión de dichos receptores en las células NK y los linfocitos T CD8⁺ con el objetivo de determinar su posible influencia en la susceptibilidad y/o pronóstico del melanoma cutáneo.

OBJETIVOS

1. Estudiar el polimorfismo génico de los receptores KIR y de los ligandos HLA de clase I en pacientes con melanoma y en una población control.
2. Analizar los subtipos de células NK y linfocitos T CD8⁺ que expresan receptores KIR en pacientes con melanoma y en una población control.
3. Estudiar el polimorfismo génico del receptor NKG2D y las variantes alélicas que codifican la molécula MICA en pacientes con melanoma y en una población control.
4. Analizar la expresión del receptor NKG2D en las células NK y los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con melanoma y de una población control.
5. Estudiar los niveles de proteína MICA soluble en muestras de plasma de pacientes con melanoma al diagnóstico y de una población control.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En el presente trabajo se han estudiado, en un grupo de pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo, diversos parámetros inmunológicos que podrían estar condicionando la susceptibilidad y/o protección frente a la enfermedad, así como su correlación con la evolución de la misma.

El estudio recogido en este trabajo ha sido 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. DIAGNÓSTICO DEL MELANOMA

El diagnóstico de melanoma se realizó mediante la inspección clínica, así como una dermatoscopia y una biopsia de la lesión cutánea con el consiguiente estudio anatomopatológico.

2.1. Inspección clínica

La inspección clínica se realizó atendiendo a una serie de signos que ayudan a identificar lesiones pigmentadas clínicamente sospechosas de melanoma o que tienen la posibilidad de evolucionar a un melanoma, empleando el sistema ABCDE (tabla 1) propuesto en los años 70 por el National Health Institute de USA:

- (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.
- (E) Evolución: Cambios en el tamaño, forma, color o aspecto durante el tiempo transcurrido desde su aparición o detección.

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 translúcido, que hace transparente la capa córnea, puede visualizarse directamente el patrón morfológico de los melanocitos atípicos y su proliferación.

2.3. Biopsia de la lesión cutánea

El diagnóstico de certeza del melanoma requiere la extirpación de la lesión sospechosa para ser estudiada al 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

En este trabajo se ha estudiado una serie de 233 pacientes caucásicos con diagnóstico histológico de melanoma cutáneo maligno, en estadio clínico y con características clínicas diferentes en el momento del diagnóstico, que fueron reclutados por el Servicio de Dermatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca entre los años 1996 y 2013. En paralelo se estudió un grupo de 200 individuos sanos compatibles en edad y sexo procedentes de la misma área geográfica.

3.1. Criterios de selección de pacientes

Los pacientes se seleccionaron siguiendo los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

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.

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 segregación de los 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. Por operatividad, se consideraron dos grupos en función de la presencia o no de metástasis linfáticas en ganglio centinela:
 - Presencia de Metástasis en GC.
 - Ausencia de Metástasis en GC.

3.2.2. Variables histológicas

– **Índice de Breslow:** para describir el espesor o índice de Breslow se utilizó la clasificación propuesta por la AJCC en el año 2010 (Edge et al. 2010).

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

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

- Menor o igual a 1 mm (≤ 1 mm).
- Mayor de 1 mm (> 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).
- Melanoma espitzoide (ME).

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.

4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre de pacientes y controles se obtuvieron por punción venosa y fueron recogidas en tubos vacutainer anticoagulados (Beckton Dickinson, Mountain View CA, USA), para la posterior extracción de ADN genómico.

También se obtuvo un tubo de heparina sódica para la separación de plasma. Las muestras de plasma fueron guardadas a -80°C hasta el momento de su utilización. Con el resto de la muestra de sangre se realizó una centrifugación en gradiente de ficoll para separar las células mononucleadas, que posteriormente fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización para realizar los ensayos de citometría de flujo.

4.1. Biopsia selectiva del ganglio 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.

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” (figura 25) que consiste en inyectar 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. Esta radioactividad 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.

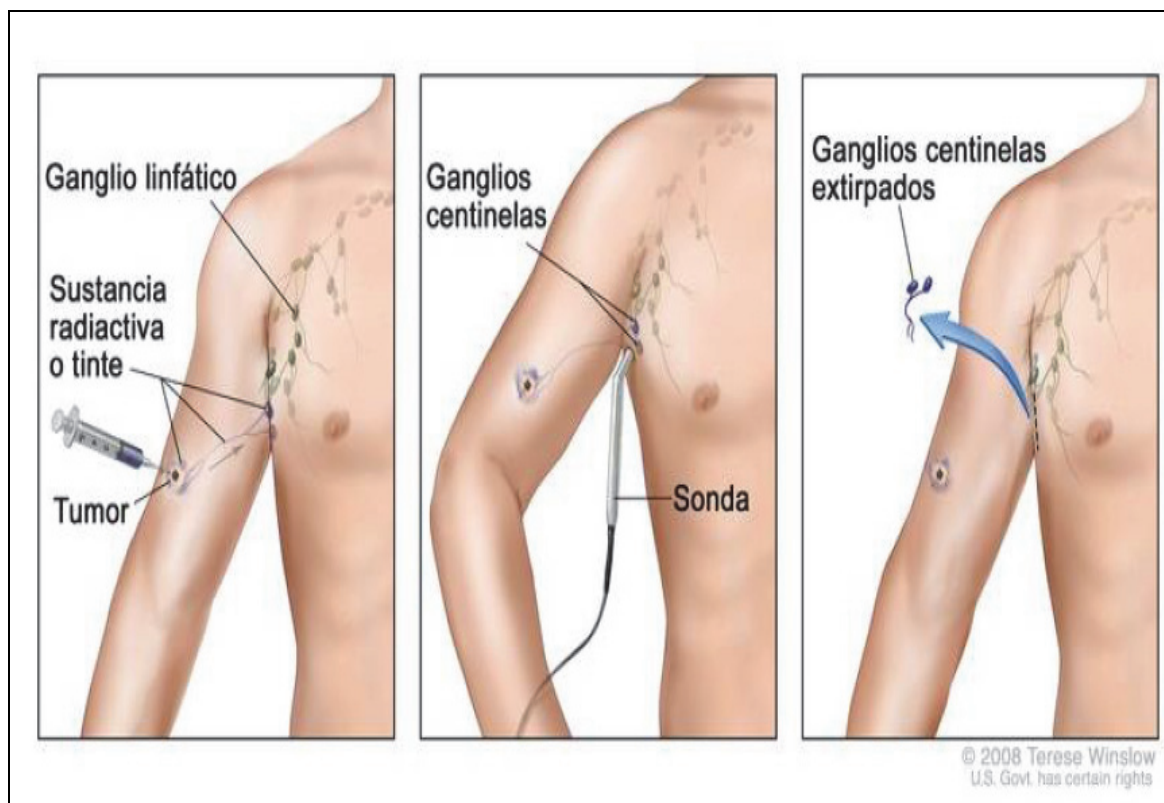


Figura 25. Biopsia del ganglio centinela. Una sustancia radiactiva o un tinte azul se inyecta cerca del tumor (imagen izquierda). El material inyectado se localiza visualmente o con un dispositivo que detecta radiactividad (imagen del centro). Los ganglios centinelas (los primeros ganglios que absorben el material) se extraen y estudian para verificar la presencia de células cancerosas (imagen derecha). La biopsia del ganglio linfático centinela se puede hacer antes o después de extirpar el tumor. *Winslow T, 2008. National Cancer Institute.*

4.2. Extracción y amplificación de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit QIAamp DNA Blood Midi (QIAGEN, Hilden, Alemania). El ADN extraído se depositó en tubos Eppendorf de 1,5ml (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) que se guardaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría y amplificado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Para realizar la amplificación, se utilizaron los termocicladores ABI2720 y GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La calidad del producto de PCR fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa.

5. TIPAJE DE LOS GENES KIR

El tipaje de los genes KIR se realizó por el método de PCR-SSP descrito por Vilches et al. (2007), a partir de ADN genómico de los pacientes y controles incluidos en el estudio. Alternativamente, se utilizó el método de PCR-SSO (Luminex technology, Tepnel Lifecodes, CMDCAS, Canadá). Mediante estos métodos se detectó un total de 16 genes que codifican para siete receptores KIR inhibidores (2DL1-L3/2DL5 y 3DL1-L3), seis receptores KIR activadores (2DS1-S5 y 3DS1), un receptor KIR activador con potencial inhibidor (KIR2L4), y dos pseudogenes (KIR2DP1 y KIR3DP1).

5.1. Tipaje de los genes KIR por PCR-SSP

Consiste en la amplificación de ADN con cebadores de secuencia específica, por lo que se usa para cada gen KIR un conjunto de cebadores cuyas secuencias discriminan los diferentes genes presentes en la muestra a estudio, de tal forma que solo se produce la reacción de amplificación cuando el ADN contiene el gen que corresponde al grupo de cebadores de la reacción (figura 26).

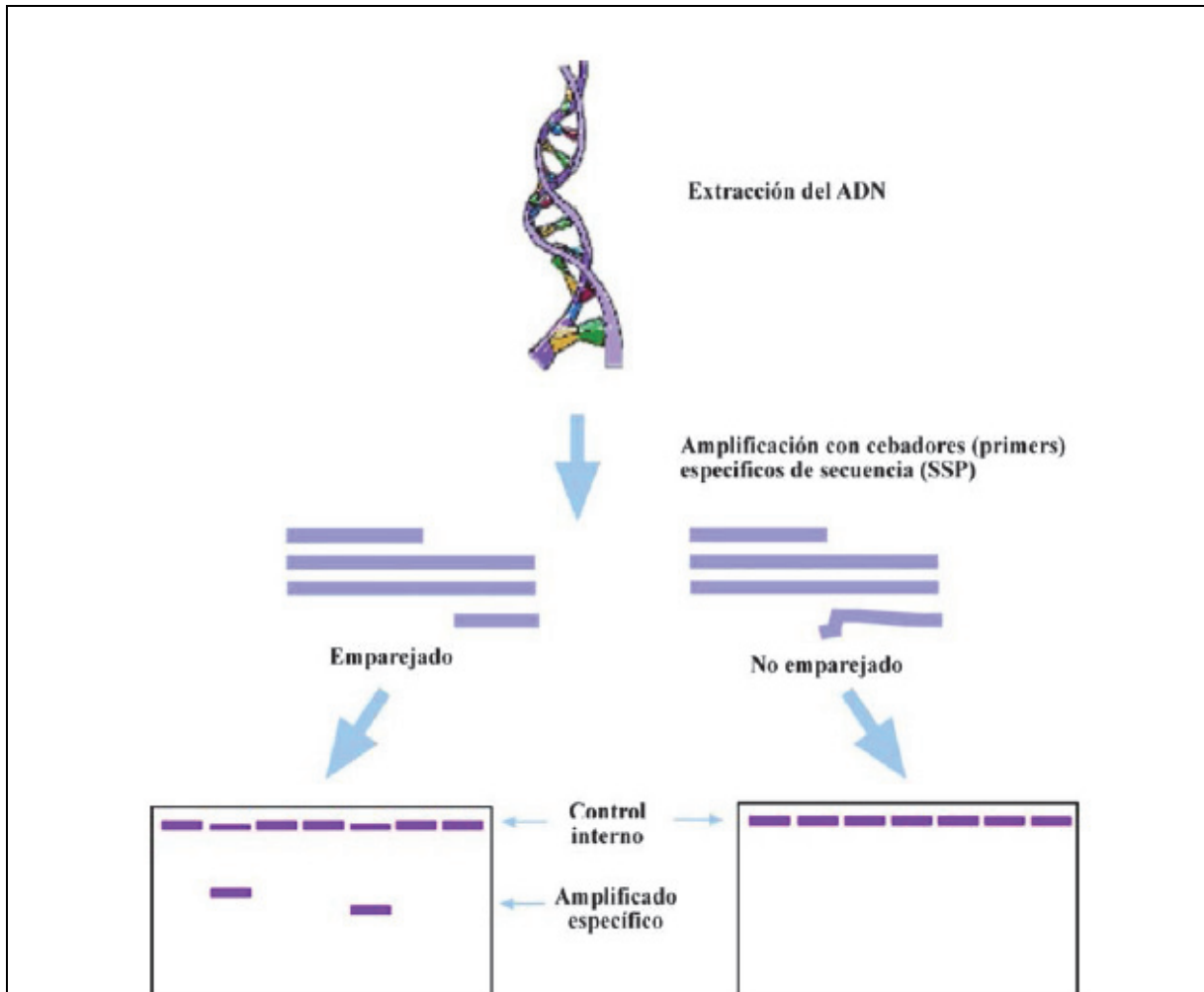


Figura 26. Esquema del tipaje de los genes KIR mediante PCR-SSP. El tipaje de los genes KIR por PCR-SSP se realiza mediante el uso de cebadores específicos de secuencia para cada gen KIR, de tal manera que cuando estos cebadores se emparejan con la secuencia complementaria específica en el ADN de la muestra se producirá la amplificación del fragmento específico de ADN, mientras que cuando los cebadores no emparejan, no se producirá amplificación.

La amplificación de los distintos genes KIR se realizó empleando distintos cebadores para cada uno de los genes a amplificar cuyo nombre, secuencia y concentración se puede observar en la tabla 8.

Tabla 8. Cebadores o primers empleados para el genotipado KIR mediante PCR-SSP.

Gen	Cebador			Cebador anti-sentido			Pb
	Nombre	Secuencia (5'-3')	µM	Nombre	Secuencia (5'-3')	µM	
1 <i>KIR2DL1</i>	<i>Fa517</i>	gttggcagatgtcatgtttgaa	0.5	<i>Rc621</i>	cctgccaggcttgcg	0.5	142
2 <i>KIR2DL2</i>	<i>Fcon750</i>	aaaccttctctcagccca	2.5	<i>Rt854</i>	gccctgcagagaacctaca	2.5	142
3 <i>KIR2DL3</i>	<i>Fcon1254</i>	agaccctcaggagggtga	2.5	<i>Rt1375</i>	caggagacaacttggatca	2.5	156
4 <i>KIR3DL1</i>	<i>Ft624</i>	ccatyggctccatgatgct	2.5	<i>Rt697</i>	ccacgatgtccagggga	2.5	108
	<i>Ftt624</i>	tccatcgttccatgatgtt	2.5				
5 <i>KIR3DL2</i>	<i>Fg864</i>	catgaacgtaggctccg	0.5	<i>Rc962</i>	gaccacacgcagggcag	0.2	131
6 <i>KIR2DS1</i>	<i>Fg621</i>	tctccatcagtcgatgag	2.5	<i>Rcon682</i>	ggtcactgggagctgac	2.5	96
	<i>Fg621b</i>	tctccatcagtcgatgaa	2.5				
7 <i>KIR2DS2</i>	<i>Fa546</i>	tgacagagaggggaagta	2.5	<i>Rcon621</i>	ccctgcaaggcttctgca	2.5	110
8 <i>KIR2DS3</i>	<i>Ft803</i>	ctgtcctgcagctcct	1.25	<i>Ra925</i>	gcactgtgagttcctcct	1.25	158
9 <i>KIR2DS4</i>	<i>Fat781</i>	ggttcaggcaggagagaat	2.5	<i>Rca877</i>	ctggaatgttccgtgatg	2.5	133/111
10 <i>KIR2DS5</i>	<i>Fc551</i>	agagaggggacgtttaacc	2.5	<i>Rcon662</i>	ctgatagggggagtgagt	2.5	147
11 <i>KIR3DS1</i>	<i>Fg624</i>	catcggttccatgatgag	2.5	<i>Rt697</i>	ccacgatgtccagggga	2.5	107
	<i>Fg624b</i>	catcagttccatgatgag	2.5				
12 <i>KIR2DP1</i>	<i>Fc567</i>	cgacacttgcacctcac	0.625	<i>Rdel674</i>	gggagctgacaactgatg	0.625	141
13 <i>KIR3DL3</i> <i>KIR3DX1</i>	<i>Fg510</i>	aatgttggtcagatgtcag	2.5	<i>Rta669b</i>	gcygacaactcatagggta	2.5	196
	<i>Fma920</i>	tttctgtggccgtgcaa	2.5	<i>Rdel967b</i>	gtcactgggggcttatag	2.5	88
14 <i>KIR2DL4</i>	<i>Ftgc157b</i>	tcaggacaagccctctgc	2.5	<i>Rga250b</i>	ggacagggaccccatcttc	2.5	131
15 <i>KIR2DL5</i>	<i>Fag843</i>	atctatccaggaggaggag	1.25	<i>Rc953</i>	catagggtgagtcagggag	1.25	147
16 <i>KIR3DP1</i>	<i>Fi2-89</i>	gtgtgtaggagccttag	1.25	<i>Rg287</i>	gaaaacgggttttcggaatac	1.25	279
	<i>Fa-97b</i>	gtacgtcacctccatgatgta	1.25				

Para la amplificación de los distintos genes KIR se empleo una mezcla Biomix Red 2x (Bioline; BIO-25006) que contiene la mezcla de reactivos que se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Reactivos de la mezcla Biomix Red.

<p style="text-align: center;">Biotaq DNA polimerasa 1U/ml</p> <p style="text-align: center;">dNTPs 2mM</p> <p style="text-align: center;">(NH₄)₂SO₄ 32mM</p> <p style="text-align: center;">Tris HCL (PH 8.8 at 25⁰C)</p> <p style="text-align: center;">Tween 20 0.02%</p> <p style="text-align: center;">MgCl₂ 4mM</p> <p style="text-align: center;">Estabilizador</p> <p style="text-align: center;">Colorante de carga</p>

Los volúmenes de los reactivos utilizados por cada muestra de ADN en las reacciones de PCR para la amplificación de los 16 genes KIR ensayados se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Volúmen de los reactivos utilizados para la amplificación de los distintos genes KIR por cada muestra de ADN.

Reacciones	1,2,3,5,7,8,9,10,12,14,15	4,6,11,16	13
Biomix Red 2x	5µl	5µl	5µl
Cebadores	F 0.5µl R 0.5µl	F1 0.5µl F2 0.5µl R 0.5µl	F1 0.5µl F2 0.5µl R1 0.5µl R2 0.5µl
Controles	Control F 0.5µl Control R 0.5µl	Control F 0.5µl Control R 0.5µl	Control F 0.5µl Control R 0.5µl
DNA	1µl	1µl	1µl
H₂O	2µl	1.5µl	1µl
Vol. Total	10µl	10µl	10µl

F, Forward; R, Reverse.

Las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de los genes KIR por PCR-SSP se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de PCR empleadas en el proceso de amplificación por PCR-SSP.

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
95°C	2 min	(1)
94°C	10 sec	
65°C	40 sec	(10)
94°C	20 sec	
61°C	20 sec	(20)
72°C	30 sec	
4°C	∞	

Una vez realizada la reacción de amplificación, se realizó la electroforesis de los productos de amplificación obtenidos en geles de agarosa al 2.5%-3% y el gel se reveló con bromuro de etidio.

5.2. Tipaje de los genes KIR por PCR-SSO

Como método alternativo de tipaje de los genes KIR se empleó el método de PCR-SSO reversa utilizando el KIT LIFECODES KIR SSO Typing Kit (Luminex technology, Tepnel Lifecodes, CMDCAS, Canada), de acuerdo con las especificaciones del fabricante, utilizando la mezcla de amplificación que se detalla en la tabla 12.

Tabla 12. Mezcla de amplificación empleada en el tipaje KIR mediante PCR-SSO

Componente	Volumen por muestra (µl)
Lifecodes master mix (MX-K1, MX-K2)	6
Taq polimerasa	0.2
H ₂ O libre de nucleasas	Completar hasta 20

Las condiciones de amplificación empleadas para el tipaje de los genes KIR por PCR-SSO se describen en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de amplificación de los genes KIR mediante PCR-SSO.

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
95°C	2 min	(1)
94°C	30 sec	
59°C	90 sec	(40)
72°C	30 sec	
72°C	15 min	(1)
4°C	∞	

Posteriormente, se hibridó 5 µl de ADN amplificado de cada muestra con 15 µl de la mezcla de sondas y se preparó una mezcla de solución con estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE) Conforme a las especificaciones del KIT.

Por último, se añadió 100 µl de la mezcla de SA-PE por muestra en las condiciones que especifica el kit y se adquirieron las muestras en un equipo Luminex^R XMAPTM. Los resultados fueron analizados con el software Quicktype y Match it! DNA V1.1 ambos de LIFECODES^R.

6. GENOTIPAJE DE LAS MOLÉCULAS HLA

El tipaje de las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C se realizó empleando métodos de PCR-SSO y PCR-SSP, como se describe a continuación.

6.1. Genotipaje de HLA-A y HLA-B por PCR-SSO

El tipaje de los genes HLA-A y HLA-B se realizó por el método de PCR-SSO reversa utilizando los kits LABType[®] SSO Class I A y Class I B Locus Typing Tests (One lambda, Inc. 21001 Kittridge street, Canoga park, CA), respectivamente. Las reacciones de amplificación se realizaron preparando la mezcla de amplificación que se detalla en la tabla 14.

Tabla 14. Mezcla de amplificación empleada en el tipaje HLA-A y HLA-B mediante PCR-SSO.

Nº de reacciones	D-mix (µl)	Cebadores de amplificación (µl)	Taq Polimerasa (µl)
1	13.8	4	0.2
10	138	40	2
50	690	200	10
96	1491	432	22

Las condiciones de amplificación empleadas para el tipaje de los genes HLA-A y HLA-B por PCR-SSO se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de amplificación para el tipaje HLA-A y HLA-B mediante PCR-SSO

T (°C)	Tiempo	Nº Ciclos
96°C	3 min	(1)
96°C	20 sec	(5)
60°C	20 sec	
72°C	20 sec	
96°C	10 sec	(30)
60°C	15 sec	
72°C	20 sec	
72°C	10 min	(1)
4°C	∞	

Posteriormente, se realizaron los procesos de desnaturalización e hibridación conforme a las especificaciones del Kit.

A continuación, se preparó una mezcla de solución de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE) 1X, en función del número de muestras a testar.

Por último, se añadió la solución de SA-PE 1X a cada pocillo y se colocó la placa en un termociclador precalentado a 60 °C durante 5 minutos, se realizó un lavado y se procedió a su lectura en el equipo LABScan™100. Los resultados fueron analizados con el software HLA-Fusion™ versiones 2.0 y 3.0 de One Lambda.

6.2. Genotipaje de HLA-C por PCR-SSO reversa

Para realizar el tipaje de alelos HLA-C se empleó un método de PCR-SSO reversa, utilizando el kit HLA-C Dynal RELI-SSO (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Este método se basa en tres procesos:

- 1) Amplificación mediante PCR de una región del ADN específica del locus, en nuestro caso HLA-C mediante cebadores marcados con biotina.

- 2) Hibridación del segmento amplificado con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica inmovilizadas en una membrana de nylon.
- 3) Detección del producto amplificado unido a la sonda mediante un método colorimétrico como se muestra en la figura 27.

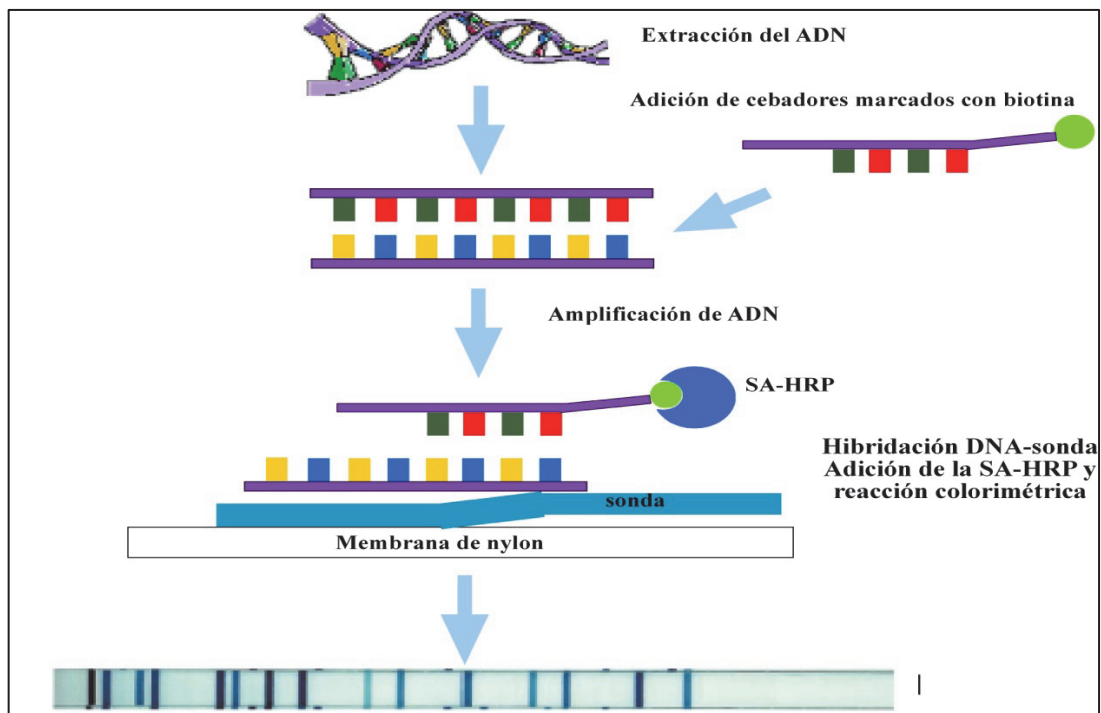


Figura 27. Esquema de tipaje de HLA-C mediante PCR-SSO reversa. El tipaje del locus HLA-C por PCR-SSO reversa se basa en la amplificación del ADN con cebadores específicos para el locus HLA-C marcados con biotina. Posteriormente se hibrida el ADN amplificado con sondas de secuencia específica para un determinado alelo HLA-C inmovilizadas en una membrana de nylon y se procede al revelado mediante la adición de HRP conjugada con streptavidina (SA-HRP). Las bandas en las que se produce una reacción colorimétrica corresponden a secuencias de alelos que se encuentran en el ADN de la muestra.

El proceso de amplificación se realizó preparando la mezcla de amplificación que se detalla en la tabla 16.

Tabla 16. Volúmen de los reactivos utilizados para la amplificación de los alelos del locus HLA-C por cada muestra de ADN.

Componentes de la PCR-SSP	Volumen por muestra (µl)
Solución 6,0 mM MgCl ₂	15
Mezcla principal	30
ADN	15

Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Condiciones de amplificación de los alelos del locus HLA-C.

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
95°C	15 sec	(35)
60°C	45 sec	
72°C	15 sec	
72°C	5 min	(1)
4°C	∞	

Tras el proceso de amplificación por PCR, se realizó la hibridación de las muestras con sondas específicas en un equipo DynalAutoRELI™. Una vez concluido el proceso de hibridación, se revelaron las tiras con estreptavidina-peroxidasa y se realizó la lectura de las mismas mediante un escáner. La interpretación de los resultados se realizó con el software Dynal RELI™ SSO.

6.3. Genotipaje de HLA-C por PCR-SSP y PCR-SSO

Como métodos alternativos para el genotipaje del locus HLA-C se empleó una PCR-SSP, utilizando el kit SSP1C (One Lambda, Inc. 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA) y una PCR-SSO utilizando el KIT LM-C de LIFECODES (Luminex technology, Tepnel Lifecodes, CMDCAS, Canada) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

La mezcla de amplificación empleada para el tipaje del locus HLA-C por PCR-SSP se detalla en la tabla 18. Posteriormente, se realizó la electroforesis de las muestras en un gel al 2,5-3% de agarosa, y los resultados se

interpretaron con ayuda del programa HLA Fusion v 2.0 y v 3.0 (One Lambda, Inc 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801, EE. UU.).

Tabla 18. Volúmen de los reactivos utilizados para la amplificación de los alelos del locus HLA-C por cada muestra de ADN.

Componentes de la PCR-SSP	Volumen por muestra (µl)
D-MIX	270
ADN	30
Taq-polimerasa	1.5

Las condiciones de amplificación empleadas para el tipaje de HLA-C por PCR-SSP de muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de amplificación de los alelos del locus HLA-C por PCR-SSP.

T(°C)	Tiempo	NºCiclos
94°C	120 sec	
65°C	60 sec	(1)
94°C	10 sec	
65°C	60 sec	(9)
95°C	10 sec	
65°C	60 sec	(20)
72°C	30 sec	
4°C	∞	

En el tipaje de los alelos del locus HLA-C mediante PCR-SSO se utilizó la mezcla de amplificación que se detalla en la tabla 20.

Tabla 20. Volúmen de los reactivos utilizados para la amplificación por PCR-SSO de los alelos del locus HLA-C por cada muestra de ADN.

Componentes de la PCR-SSO	Volumen por muestra (µl)
Mezcla maestra LIFECODES	7.5
Taq polimerasa	0.25
H ₂ O libre de nucleasas	Completar hasta 25

Las condiciones de amplificación empleadas para el tipaje de HLA-C mediante PCR-SSO se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Condiciones de amplificación de los alelos del locus HLA-C por PCR-SSO.

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
95°C	5 mins	(1)
95°C	30 sec	(8)
60°C	45 sec	
72°C	45 sec	
95°C	30 sec	(32)
63°C	45 sec	
72°C	45 sec	
72°C	5 min	(1)
4°C	∞	

Posteriormente, se realizó la hibridación de cada muestra con sondas específicas tal y como se detalla en las especificaciones del Kit.

Se preparó una solución de streptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE), se añadió 100 µl de la mezcla de SA-PE por muestra, y se adquirió las muestras en un equipo Luminex XMAP™. Los resultados se analizaron con el software (MATCH IT! DNA v1.2 LIFECODES).

7. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LA REGIÓN NKC MEDIANTE ENSAYO DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

El ensayo de discriminación alélica es un ensayo multiplex (en el que cada reacción incorpora más de un par de cebadores/sondas), a punto final (la información se recoge al final del proceso de PCR), que detecta variantes de un único nucleótido en la secuencia de ADN. La presencia de dos pares de cebadores y sondas en cada reacción permite el genotipado de las dos posibles variantes o polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en una secuencia de ADN diana.

Para cada una de las muestras analizadas se emplea un par de detectores fluorescentes (ej, dos sondas TaqMan® MGB que tienen como diana un sitio de polimorfismo de nucleótido simple), de este modo, una de las sondas fluorescentes hibrida específicamente a la secuencia de uno de los alelos (alelo 1) y la otra sonda al otro alelo (alelo 2).

Este ensayo de discriminación alélica clasifica las muestras como:

- Muestras homocigotas: tienen el alelo 1 o el alelo 2.
- Muestras heterocigotas: tienen el alelo 1 y el alelo 2.

En este ensayo se mide el cambio en la fluorescencia de los dos distintos fluorocromos (VIC y FAM) asociados con las sondas específicas para cada variante alélica. En la figura 28 se muestra un ejemplo de hibridación entre las secuencias diana y las sondas en ensayos de genotipaje TaqMan®.

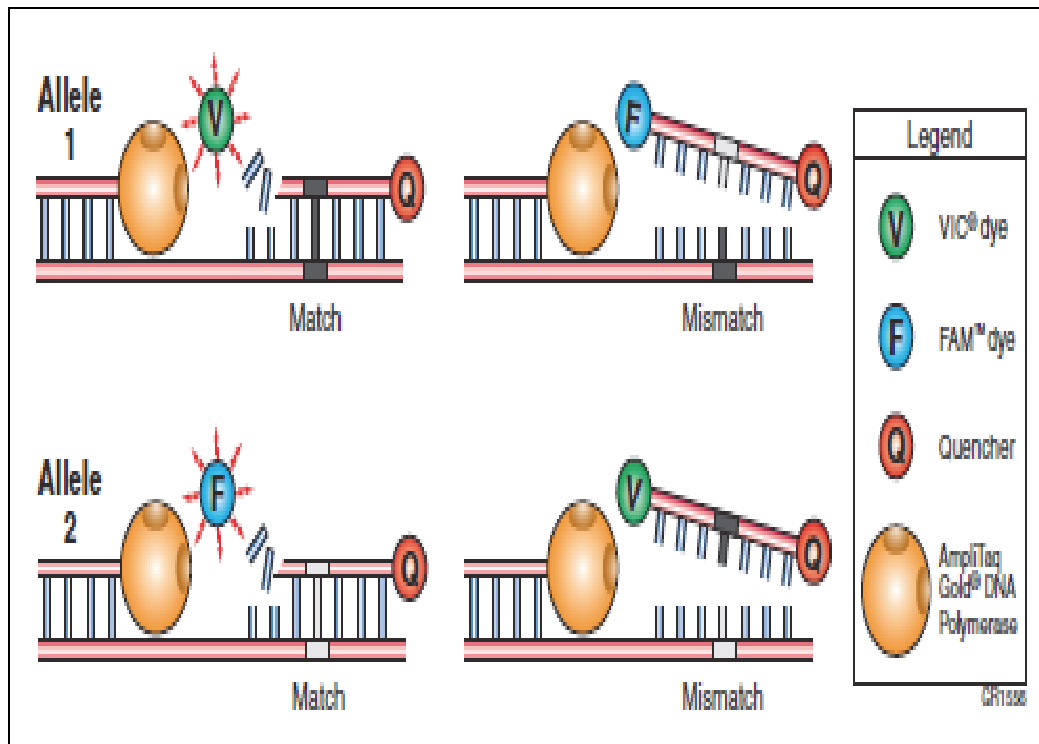


Figura 28. Hibridación de sondas en el ensayo TaqMan® de discriminación alélica. Para cada muestra se emplean dos sondas que tienen como diana la secuencia donde se localiza el SNP. Cada una de estas dos sondas va conjugada con un fluorocromo diferente y un quencher, y tiene la secuencia complementaria exacta para cada uno de los alelos del SNP. Cuando la sonda hibrida con la secuencia complementaria en el ADN de la muestra, la Taq polimerasa libera el fluorocromo y éste emite fluorescencia al quedar separado del quencher.

La interpretación de los resultados obtenidos mediante el ensayo TaqMan de discriminación alélica depende de las señales de fluorescencia detectadas, tal y como se muestra en la figura 29.

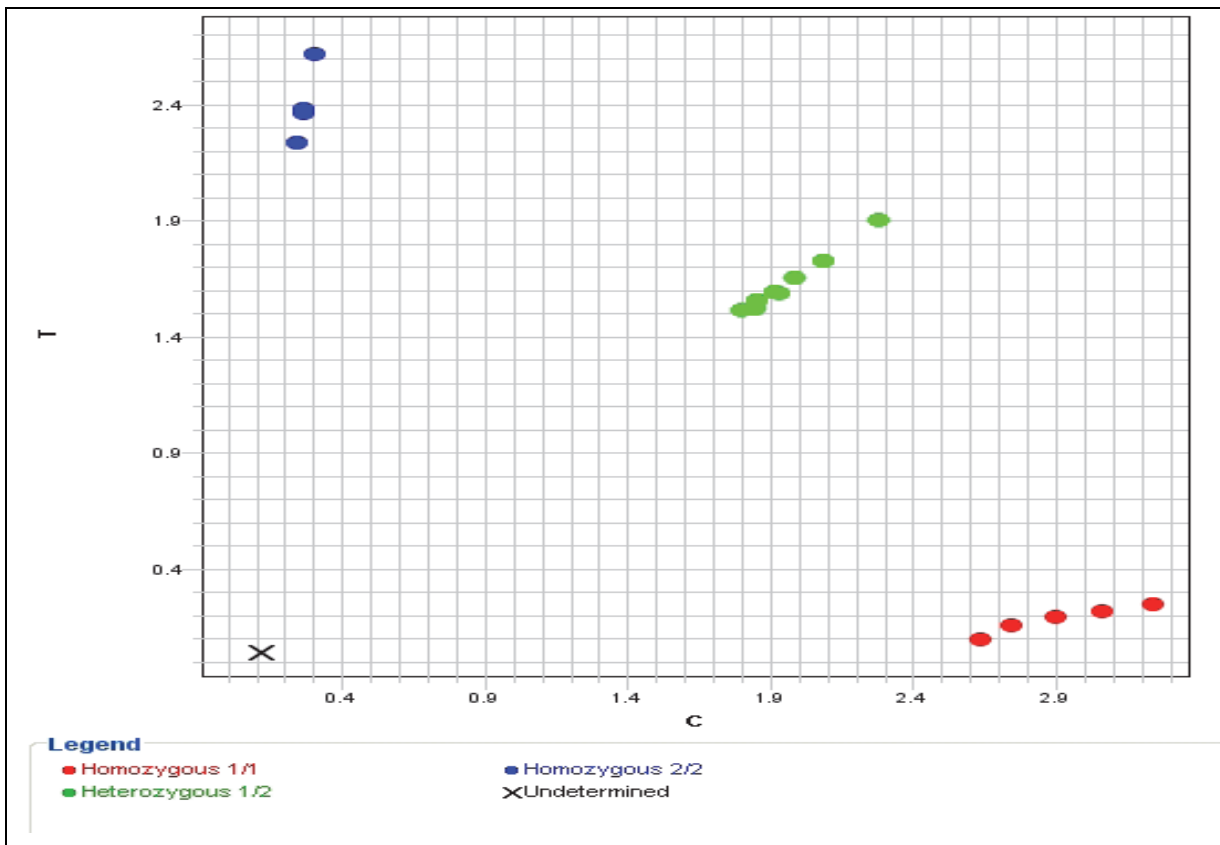


Figura 29. Interpretación de resultados del ensayo TaqMan® de discriminación alélica para la región NKC. Se representa un diagrama de puntos de un ensayo Taq-Man de discriminación alélica. En rojo se observan las muestras homocigotas para el alelo 1 (solo emite señal la sonda conjugada con VIC), en verde las muestras heterocigotas portadoras tanto del alelo 1 como del alelo 2 (emiten señales ambas sondas, la conjugada con VIC y la conjugada con FAM) y en azul las muestras homocigotas para el alelo 2 (solo emite señal la sonda conjugada con FAM).

En nuestro caso, el ensayo de discriminación alélica se realizó con el objetivo de detectar polimorfismos de nucleótido simple en una región de 270 kb, localizada dentro de una región de aproximadamente 2 Mb denominada complejo de receptores de células NK o “natural killer complex” (NKC), situada en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.2p12.3). Para la realización de este ensayo se ha estudiado un total de ocho SNPs, previamente relacionados con actividad citotóxica (Hayashi et al 2006). De estos 8 SNPs, siete están localizados en la región génica que codifica para el receptor NKG2D (NKC3, NKC4, NKC7, NKC9, NKC10, NKC11, NKC12), y uno, NKC17 en la región promotora del gen NKG2A (Ver figura 21).

La secuencia de los cebadores sentido y antisentido empleados para amplificar los ocho SNPs estudiados se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Secuencias diana de los SNP incluidos en el estudio.

NKC	SNP Id (NCBI)	Ref.ensayo Applied Biosystems	Contexto de la secuencia del ensayo (VIC/FAM)	Var
3	rs1049174	C_9345347_10	F TGTGGAGGGTGGGGTTGCACTCTCA[C/G] R TGATCTGCTGGCCTTCTCTTCCTTC	C/G
4	rs2255336	C_22274476_10	F TTTAGGAATACAGCACTCCATATTG[C/T] R TACCATAATAATGAAACGGATTCCC	C/T
7	rs2617160	C_1841959_10	F CTATTTTCATTACAGCTAGGTATTA[A/T] R GTACTGGGCTACACATACTGACATA	A/T
9	rs2246809	C_1842497_10	F ACATAGCTATAAATAAAAACACAGT[A/G] R TAATCTCCTGTGCATTAATAAATTT	A/G
10	rs2617169	Diseño propio	F GGAGAAAAGGACATGCCCTCATAT[T/A] R GTCTCTAAAGGGATGCAAAATGATAATAAAATGT	T/A
11	rs2617170	C_1842316_10	F CTGCATTCTTCTATTCAGGGAAAAA[C/T] R TGTTCTGCTCCAGTACTCCAATACC	C/T
12	rs2617171	C_26984346_10	F AGTCATGAAATCAGAATACATCTCT[C/G] R TGTGTGTGTATCATATATACATATA	C/G
17	rs1983526	C_11919464_10	F CTCTGAGGCACTAAATAGGATACAA[C/G] R CCTGCTAGAAGCCCTAGTAAAAGGA	C/G

En rojo se observa la localización de cada SNP en la secuencia, así como la variación de nucleótido que tiene lugar en cada SNP. Los cebadores para el SNP NKC-10 fueron de diseño propio.

Posteriormente, se preparó la mezcla de amplificación según el número de muestras a realizar empleando los volúmenes indicados en la tabla 23.

Tabla 23. Volúmenes de los reactivos empleados en el ensayo de discriminación alélica.

Concentración Final	Reactivo	Volumen por muestra (µl)
1X	PCR master mix PE 2X	12.5
	MIX 10X NKC's	2.5
	H ₂ O	5
	DNA diluído de muestras/controles	10
	Total (µls)	25
0.0625 µg		

Por último, se introdujo la placa de reacción en el aparato ABI Prism^R 7000 sequence detection system y se asignaron los alelos a cada una de las muestras y controles analizados.

8. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN NKC

Como método alternativo al ensayo de discriminación alélica, y para resolver genotipos dudosos, se empleó la secuenciación por el método de Sanger de la región NKC que contiene los diferentes SNPs estudiados, empleando el Kit Big Bye Terminator cycle sequencing (Applied Bio systems, Foster City, CA, USA).

La amplificación de las regiones de interés se realizó utilizando el kit AmpliTaqGold (Applied Biosystems) empleando la mezcla de amplificación que se detalla en la tabla 24.

Tabla 24. Mezcla de amplificación para la secuenciación de la región NKC

Reactivo	Volumen por muestra (µl)
Tampón 10x	2.5
Cl ₂ Mg	2
Primer F+R (10 µM)	2
dNTP	0.2
Taq Pol	0.25
Agua	25

Las condiciones de amplificación empleadas en la secuenciación de la región NKC se detallan en la tabla 25.

Tabla 25. Condiciones de amplificación empleadas en la secuenciación de la región NKC

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
95 °C	5 min	(1)
95 °C	30 sec	(35)
55 °C	40 sec	
72 °C	40 sec	
72 °C	7 min	(1)
4 °C	∞	

Posteriormente se realizó la purificación de los productos de PCR mezclando 5 µl del producto de PCR con 2 µl de Exo-SAP-IT[®] por reacción. La purificación se realizó con las condiciones de temperatura y tiempo que se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Condiciones empleadas para la purificación de los productos de amplificación

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
37°C	15 min	(1)
80°C	15 min	(1)
4°C	∞	

A continuación, se procedió a la secuenciación de los productos de PCR purificados utilizando el kit Big Dye Terminator cycle sequencing 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La mezcla de amplificación empleada para la secuenciación se detalla en la tabla 27.

Tabla 27. Mezcla de amplificación empleada en la secuenciación de la región NKC.

Reactivo	Volumen por muestra (µl)
Big Dye Terminator	1
cebador	1
Agua	2

Las condiciones de amplificación empleadas para la reacción de secuenciación se detallan en la tabla 28.

Tabla 28. Condiciones de amplificación empleadas en la reacción de secuenciación.

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
96°C	1 min	(1)
96°C 60°C	10 sec 2 min	(40)
4°C	∞	

Posteriormente, se purificaron los productos de secuenciación mediante el empleo de columnas (Performa® DTR Gel Filtration Cartridges, EdgeBio).

Por último, se realizó la electroforesis de los productos de secuenciación purificados en el secuenciador genético ABI 3500 (Applied Biosystems), y las secuencias se analizaron con el programa Sequencing Analysis Software v5.4, Applied Biosystems.

9. TIPAJE DEL GEN MICA

El tipaje del gen MICA se realizó por el método de PCR-SSO reversa utilizando el kit LABType® MICA Locus Typing Test (One lambda, Inc. 21001 Kittridge street, Canoga park, CA). Las reacciones de amplificación se realizaron preparando la mezcla de amplificación que se detalla en la tabla 29.

Tabla 29. Mezcla de amplificación empleada para el tipaje del gen MICA por PCR-SSO.

Nº de reacciones	D-mix (µl)	Cebador de amplificación (µl)	Taq Polimerasa (µl)
1	13.8	4	0.2
10	138	40	2
50	690	200	10
96	1491	432	22

Las condiciones de amplificación empleadas para el tipaje del gen MICA por PCR-SSO se detallan en la tabla 30.

Tabla 30. Condiciones de amplificación empleadas en el tipaje del gen MICA por PCR-SSO.

T(°C)	Tiempo	Nº Ciclos
96°C	3 min	(1 ciclo)
96°C	20 sec	(5 ciclos)
60°C	20 sec	
72°C	20 sec	(30 ciclos)
96°C	10 sec	
60°C	15 sec	
72°C	20 sec	(1 ciclo)
72°C	10 min	
4°C	∞	

Posteriormente, se realizaron los procesos de desnaturalización e hibridación conforme a las especificaciones del Kit.

A continuación, se preparó una mezcla de solución de streptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE) 1X, en función del número de muestras a testar.

Por último, se añadió la solución de SAPE 1X a cada pocillo, se colocó la placa en un termociclador precalentado a 60 °C durante 5 minutos, se realizó un lavado, y se procedió a su lectura en el aparato LABScan™ 100. Posteriormente, los resultados fueron analizados con el software HLA-Fusion™ versiones 2.0 y 3.0 de One Lambda.

10. CITOMETRÍA DE FLUJO

10.1. Determinación de las poblaciones celulares que expresan receptores KIR en sangre periférica de pacientes con melanoma por citometría de flujo

Con el objetivo de estudiar las poblaciones de linfocitos T CD8+ y células NK CD56+ que expresan receptores KIR en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles sanos, se utilizó la serie de anticuerpos monoclonales específicos conjugados que se mencionan a continuación: Anti-CD3 Amcyan (clon SK7), anti-CD56 PE-Cy7 (clon NCAM16.2) de Becton Dickinson (San Jose, CA), anti-CD16 Pacific blue (clon 3G8) y anti-CD8 APC-Cy7 (clon SK1) de BD Pharmingen (San Diego, CA), anti-KIR3DL1 APC/Alexa 647 (clon DX9), CD158a/h PE (Clon EB6), reconoce los receptores KIR2DL1/S1, de Milteny biotec S.L. (Bergisch Gladbach, Germany), anti CD158b1/b2/j PE-Cy5/PerCP (clon gl183), reconoce los receptores KIR2DL2/L3/S2, de Beckman coulter (Brea, California), anti-CD158a FITC (Clon 143211), reconoce el receptor KIR2DL1, de R & D Systems (Minneapolis, Minnesota) (Tabla 31). El estudio de citometría de flujo se realizó a partir de células mononucleadas descongeladas obtenidas a partir de la sangre periférica de un total de 35 pacientes diagnosticados de melanoma y 24 individuos sanos. Para ello, se marcó 50 µl

de células mononucleadas con los anticuerpos monoclonales y volúmenes que se especifican en la tabla 31, y la adquisición se realizó empleando un citómetro FACS CANTO II.

Tabla 31. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio de citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ y las células NK que expresan receptores KIR.

Molécula reconocida	Fluorocromo	Clon	Vol (µl)
CD158a	FITC	143211	5
CD158a/h	PE	EB6	5
CD158b1/b2/j	PE-Cy5/PerCP	gl183	1
CD56	PE-Cy7	NCAM16.2	5
KIR3DL1	APC/Alexa 647	DX9	5
CD8	APC-Cy7	SK1	3
CD16	PB	3G8	1
CD3	AmCyan	SK7	2.5

El análisis se realizó sobre la población de linfocitos que fue seleccionada en un diagrama de tamaño (FSC) *versus* granularidad (SSC) (figura 30A). Los linfocitos T se seleccionaron por la expresión de CD3, y las células NK por la expresión de CD56 en ausencia de expresión de CD3 (figura 30B).

Posteriormente, dentro de las células NK se seleccionó la población de células NK CD56^{dim}, con una expresión intermedia de CD56 y una expresión positiva para CD16 (CD56+CD16+), y la población de células NK CD56^{bright}, con una expresión alta de CD56 y baja o negativa de CD16 (CD56++CD16-/+bajo) (figura 30C). Por último, se seleccionó la población de linfocitos T citotóxicos en base a la expresión positiva de CD8 dentro de la población de linfocitos T CD3+ (figura 30D).

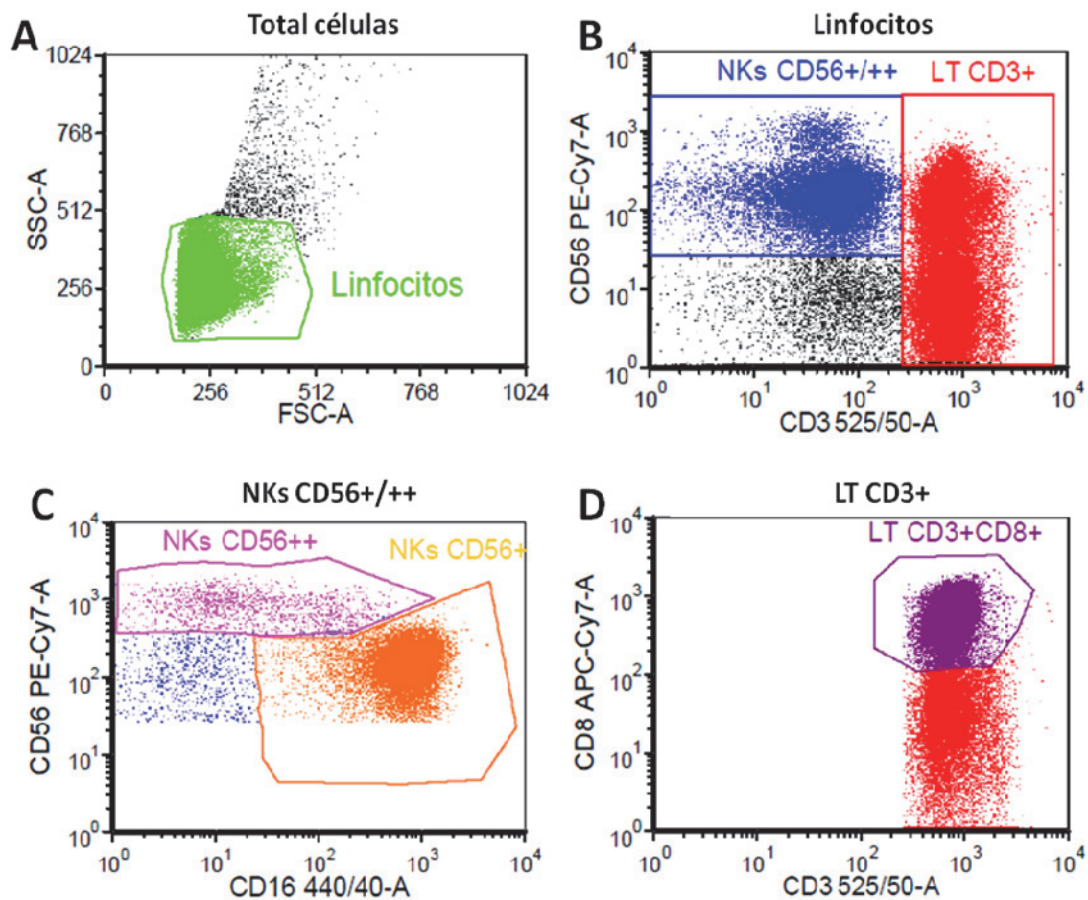


Figura 30. Análisis por citometría de flujo de linfocitos T CD8⁺ y células NK en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles. Se muestran las tres poblaciones de células de sangre periférica en las que se ha estudiado la expresión de los receptores KIR. (A) gate de linfocitos, en verde; (B) gates de células NK, en azul, y linfocitos T CD3⁺, en rojo; (C) gates de células NK CD56^{bright} o CD56⁺⁺; en rosa, y células NK CD56^{dim} o CD56⁺; en naranja; (D) gate de linfocitos T CD3⁺CD8⁺; en violeta.

Posteriormente, se analizó la expresión de CD158a/h y CD158b/j en las poblaciones de linfocitos T CD8⁺, células NK CD56⁺ y CD56⁺⁺ (figuras 31A, 31B y 31C). También se analizaron las distintas subpoblaciones de células NK que expresan CD158a/h, en función de la expresión de KIR2DL1 y/o KIR2DS1 (KIR2DL1+/2DS1⁺, KIR2DL1+/2DS1⁻, KIR2DL1-/2DS1⁺) (figura 31D). Este análisis se llevó a cabo en base a la combinación de los anticuerpos monoclonales anti-CD158a (clon 143211) y anti-CD158a/h (clon EB6) (figura 31D).

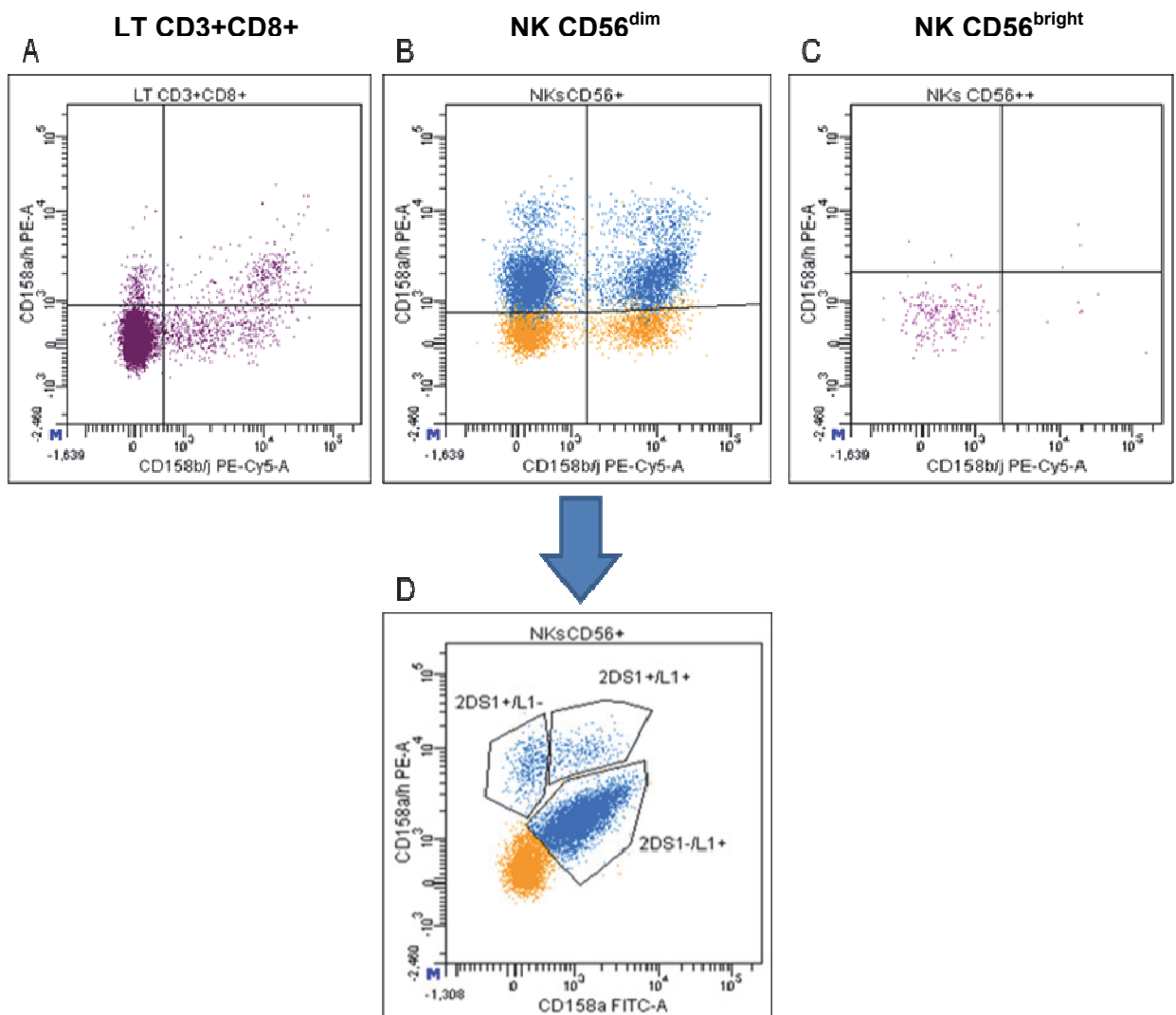


Figura 31. Análisis por citometría de flujo de poblaciones celulares que expresan CD158a/h y CD158b/j en pacientes con melanoma y controles. Se representa el análisis de las poblaciones de: (A) linfocitos T CD8; (B) células NK CD56^{dim}; (C) células NKCD56^{bright} que expresan CD158a/h y CD158b/j; (D) análisis de las subpoblaciones de células NK CD56^{dim} KIR2DL1+/2DS1-, KIR2DL1+/2DS1+ y KIR2DL1-/2DS1+, separadas mediante el marcaje con los anticuerpos CD158a/h (clon EB6) y CD158a (clon 143211).

10.2. Determinación de las poblaciones celulares que expresan NKG2D en sangre periférica de pacientes con melanoma por citometría de flujo

Con el objetivo de estudiar las poblaciones de linfocitos T CD8+ y células NK CD56+ que expresan el receptor NKG2D en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles sanos, se utilizó una serie de anticuerpos monoclonales conjugados específicos que se detallan a continuación: Anti-CD3 Amcyan (clon SK7), anti-CD56 PE-Cy7 (clon NCAM16.2) de Becton Dickinson (San Jose, CA), CD16 Pacific blue (clon 3G8) y anti-CD8 APC-Cy7 (clon SK1) de BD Pharmingen (San Diego, CA) y anti-NKG2D APC (clon 1D11) de Biolegend (tabla 32).

Tabla 32. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio de citometria de flujo de linfocitos TCD8+ y células NK que expresan NKG2D.

Molécula reconocida	Fluorocromo	Clon	Volúmen (µl)
CD56	PE-Cy7	NCAM16.2	5
NKG2D	APC/Alexa 647	1D11	7.5
CD8	APC-Cy7	SK1	1
CD16	PB	3G8	1.5
CD3	AmCyan	SK7	2.5

El estudio de citometría de flujo se realizó a partir de células mononucleadas de sangre periférica de 48 pacientes diagnosticados de melanoma y 37 individuos sanos. Para ello, se marcó 50 µl de células mononucleadas con los anticuerpos monoclonales y volúmenes que se especifican en la tabla 32, y la adquisición se realizó empleando un citómetro FACS CANTO II.

El análisis se realizó sobre la población de linfocitos que fue seleccionada en un diagrama de tamaño (FSC) *versus* granularidad (SSC). Las poblaciones de linfocitos T CD8+, células NK CD56+ y NK CD56++ fueron seleccionadas como se describe en la figura 30.

El análisis de los linfocitos TCD8+, células NK CD56+ y NK CD56++ que expresan NKG2D se realizó sobre la población de linfocitos (figura 32A). La intensidad media de fluorescencia (IMF) de NKG2D se determinó midiendo la media geométrica de la fluorescencia para APC (fluorocromo con el que va conjugado el anticuerpo anti-NKG2D), en las poblaciones de linfocitos TCD8+, células NK CD56+ y NK CD56++ (figura 32B).

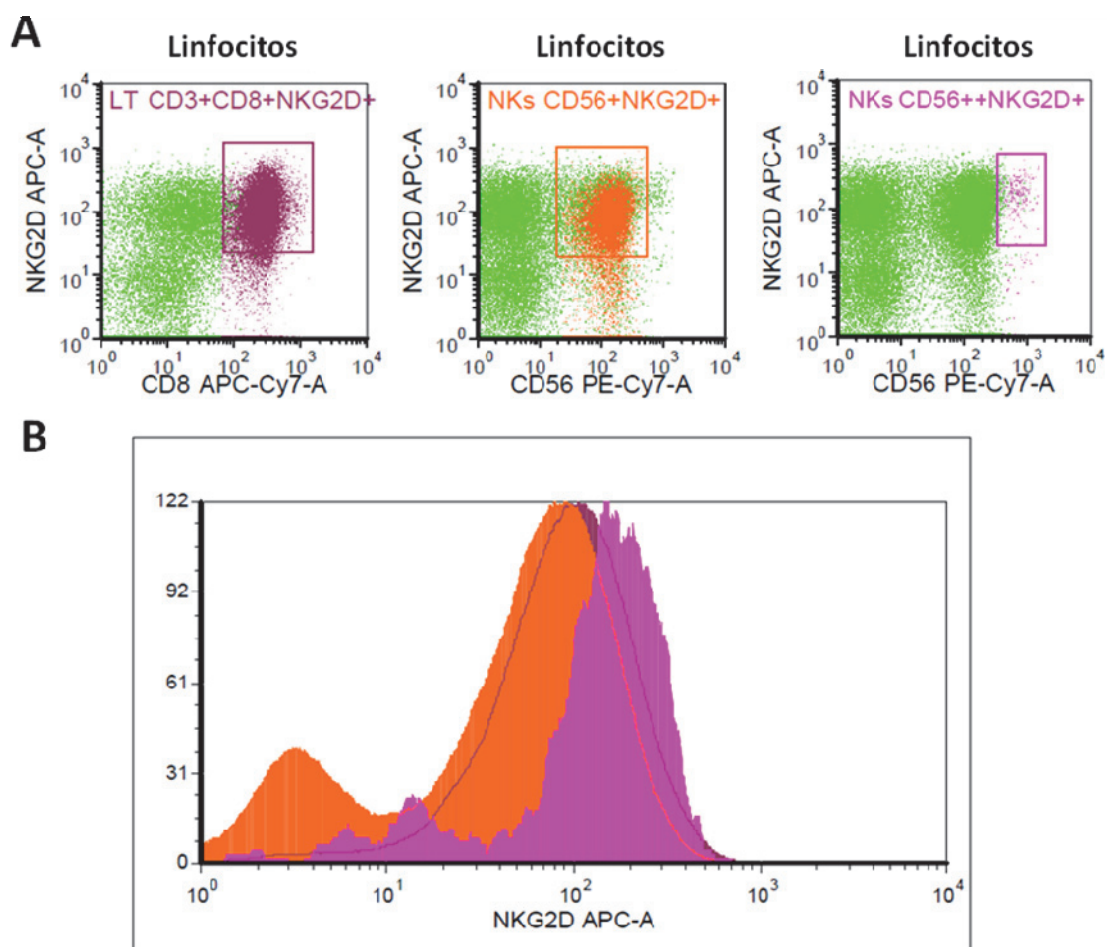


Figura 32. Análisis por citometría de flujo del porcentaje e intensidad media de fluorescencia (IMF) de linfocitos TCD8+ y células NK que expresan NKG2D en pacientes con melanoma y controles. (A) porcentajes de linfocitos T CD8+ (violeta), células NK CD56+ (Naranja) y células NK CD56++ (Rosa) que expresan NKG2D; (B) intensidad media de fluorescencia de NKG2D en linfocitos T CD8+ (pico violeta), células NK CD56+ (pico naranja) y células NK CD56++ (pico rosa).

11. DETERMINACIÓN DE MICA SOLUBLE MEDIANTE ELISA

La determinación de MICA soluble se realizó mediante un enzimoimmunoensayo tipo ELISA (HUMAN MICA ELISA KIT de AbFRONTIER), según las especificaciones del KIT. Se analizaron muestras de plasma obtenidas a partir de 30 pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo y de un grupo control constituido por 26 individuos sanos.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos del estudio se recogieron en una base de datos Microsoft Access 2.0 (Microsoft Corporation, Seattle, WA). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

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. Las frecuencias alélicas, génicas y genotípicas fueron estimadas por contaje directo y comparadas utilizando el test exacto de Fisher bilateral. Las asociaciones de los alelos o genes KIR con las variables histopatológicas y clínicas se estimaron mediante el test de chi-cuadrado y el test exacto de Fisher bilateral, y la fuerza de las asociaciones mediante la determinación de la odds ratio (OD). Los datos también fueron analizados mediante un modelo de regresión logística multivariable. El valor de "Pc" se obtuvo multiplicando el valor de "p" por el número de alelos testados para cada locus (corrección de Bonferroni) (Svejgaard and Ryder 1994). El análisis de desequilibrio de ligamiento y la definición de los bloques de haplotipos de la región génica NKC se realizó empleando el método de Gabriel mediante el programa Haploview 4.0. Las comparaciones entre las distintas poblaciones celulares fueron realizadas utilizando el test ANOVA de una vía y el test de Kruskal-Wallis. Los valores de "p" menores de 0.05 fueron considerados como significativos. Las concentraciones medias de MICA soluble en plasma fueron comparadas mediante los test *t*-Student y Mann-Whitney. El estudio de supervivencia se realizó mediante un análisis de kaplan-meier y los valores de p fueron determinados mediante el test de Log-rank.

RESULTADOS

1. ESTUDIO GENÉTICO: SERIE ESTUDIADA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS AL DIAGNÓSTICO.

El estudio genético se realizó sobre un total de 233 pacientes (112 varones y 121 mujeres) con diagnóstico histológico de melanoma maligno cutáneo y 200 controles (92 varones y 108 mujeres) compatibles en edad y sexo y procedentes de la misma área geográfica. El polimorfismo de los genes KIR y HLA-I se estudió en 232 de los 233 pacientes reclutados (tabla 33)

La clasificación de los pacientes, según el tipo histológico de melanoma, fue la siguiente: 162 (69%) fueron diagnosticados de melanoma de extensión superficial (MES), 29 (12%) de melanoma nodular (MN), 16 (7%) de melanoma lentigo maligno (MLM), 13 (6%) de melanoma lentiginoso acral (MLA), 11 (5%) de melanoma in situ (MIS), 1 paciente (0.5%) de melanoma desmoplásico (MD) y 1 paciente (0.5%) de melanoma espitzoide (ME). En cuanto a las características clínicas al diagnóstico de los pacientes con melanoma, se dispuso de la medida del grosor tumoral en 232 de los 233 pacientes incluidos en el estudio, 128 (55%) de ellos presentaron un grosor tumoral ≤ 1 mm y 104 (45%) un grosor tumoral > 1 mm.

En lo referente a la ulceración, se dispuso de datos en 217 de los 233 pacientes incluidos en el estudio, 44 (20%) de ellos presentaron una lesión tumoral ulcerada y 173 (80%) una lesión tumoral no ulcerada. Finalmente, en cuanto a los datos referentes a la presencia o no de metástasis en ganglio centinela, se dispuso de datos en 141 de los 233 pacientes incluidos en el estudio, de los cuales 22 (16%) presentaron metástasis en ganglio centinela y 119 (84%) no presentaron metástasis en ganglio centinela en el momento del diagnóstico.

Tabla 33. Datos demográficos y características clínicas e histológicas al diagnóstico de los pacientes de melanoma incluidos en el estudio.

Datos demográficos	Controles N=200	Pacientes con melanoma N=233
Edad (años) ^a	51 ± 17	53 ± 15
Género		
Hombre	92	112
Mujer	108	121
Características clínicas e histológicas		N (%)
Subtipos histológicos		
MES		162 (69)
MN		29 (12)
MLM		16 (7)
MLA		13 (6)
Melanona "in situ"		11 (5)
MD		1 (0.5)
ME		1 (0.5)
Características clínicas		
Grosor tumoral		
≤ 1 mm		128 (55)
> 1 mm		104 (45)
Ulceración de la lesión primaria		
Si		44 (20)
No		173 (80)
Metástasis en GC		
Si		22 (16)
No		119 (84)

Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; MLM, melanoma léntigo maligno; MLA, melanoma lentiginoso acral; MD, melanoma desmoplásico; ME, melanoma espitzoide; GC, ganglio centinela. ^aMedia ± SEM.

2. POLIMORFISMO DE LOS GENES KIR EN PACIENTES CON MELANOMA

La frecuencia de los genes KIR estudiados fue similar en los pacientes con melanoma y en el grupo control, sin embargo, al agrupar a los pacientes en los dos tipos histológicos de melanoma más representados (MES y MN), se observó una frecuencia significativamente disminuida del gen KIR2DL3 en el grupo de pacientes con MN respecto al grupo control y al grupo de pacientes con MES (72% vs. 91% y 88%, $P=0.003$, $OR=0.26$ y $P=0.034$, $OR=0.37$, respectivamente) (Tabla 34).

Tabla 34. Frecuencia de los genes KIR en pacientes con melanoma y controles.

Genes KIR n (%)	Controles N=200 n(%)	Pacientes con melanoma		
		Totales N=232 n(%)	Subtipo histológico	
			MES N=161 n(%)	MN N=29 n (%)
KIR inhibidores				
2DL1	199 (99)	231 (99)	160 (99)	29 (100)
2DL2	119 (59)	135 (58)	89 (55)	19 (66)
2DL3	182 (91)	199 (86)	141 (88)	21 (72)^{a,b}
2DL5	82 (41)	121 (52)	78 (48)	16 (55)
3DL1	194 (97)	219 (94)	153 (95)	29 (100)
3DL2	200 (100)	232 (100)	161 (100)	29 (100)
3DL3	200 (100)	232 (100)	161 (100)	29 (100)
KIR activadores				
2DS1	62 (31)	87 (37)	57 (35)	12 (41)
2DS2	119 (59)	135 (58)	89 (55)	19 (65)
2DS3	56 (28)	74 (32)	45 (28)	12 (41)
2DS4	194 (97)	219 (94)	153 (95)	29 (100)
2DL4*	200 (100)	232 (100)	161 (100)	29 (100)
2DS5	50 (25)	69 (30)	42 (26)	9 (31)
3DS1	71 (35)	91 (39)	60 (37)	12 (41)

^a, MN vs. controles ($P=0.003$; $OR=0.26$; IC 95%=0.10-0.67); ^b, MN vs. MES ($P=0.034$; $OR=0.372$; IC 95% 0.15-0.95). Los valores de p fueron determinados mediante un test de Fisher bilateral. Abreviaturas: KIR, killer immunoglobulin-like receptors; MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. * Receptor activador con potencial inhibidor.

El análisis de los genes KIR inhibidores en función de las características clínicas al diagnóstico (grosor tumoral, ulceración de la lesión primaria y metástasis en ganglio centinela) reveló una disminución significativa del gen KIR2DL3 en el grupo de pacientes con un grosor tumoral $> 1\text{mm}$ respecto al grupo control y a los pacientes con un grosor tumoral $\leq 1\text{mm}$ (81% vs. 91% y 90%, $P=0.009$, $OR=0.41$, $IC95\%=0.21-0.81$ y $P=0.046$, $OR=0.47$, $IC95\%=0.22-0.99$, respectivamente), así como en los pacientes con ulceración respecto al grupo control y a los pacientes sin ulceración (67% vs. 91% y 90%; $P=0.000034$, $OR=0.20$, $IC95\%=0.09-0.46$ y $P=0.00025$, $OR=0.24$, $IC95\%=0.11-0.54$, respectivamente). Por el contrario, la frecuencia del gen KIR2DL5 mostró un aumento significativo en los pacientes con un grosor tumoral $> 1\text{mm}$ respecto al grupo control (54% vs. 41%, $P=0.03$, $OR=1.71$, $IC 95\%=1.06-2.77$) y en los pacientes con ulceración con respecto al grupo control y al grupo de pacientes sin ulceración (70% vs. 41% y 50%; $P=0.001$, $OR=3.32$, $IC95\%=1.63-6.75$ y $P=0.018$, $OR=2.33$, $IC95\%=1.14-4.78$, respectivamente) (tabla 35).

Respecto al estudio de los genes KIR activadores, se observó un aumento significativo del gen KIR2DS1 en pacientes con ulceración con respecto al grupo control (49% vs. 31%; $P=0.025$, $OR=2.12$, $IC 95\%=1.09-4.15$). Así mismo, también se encontró un aumento significativo del gen KIR2DS3 en el grupo de pacientes que presentaban ulceración comparado con el grupo control y, con aquellos pacientes que no presentaban ulceración de la lesión primaria (46% vs. 28% $P=0.018$, $OR=2.24$, $IC 95\%=1.14-4.39$ y $P=0.018$, $OR=2.26$, $IC 95\%=1.14-4.49$, respectivamente) (tabla 35).

Tabla 35. Frecuencia de genes KIR en pacientes de melanoma según las características clínicas al diagnóstico.

Genes KIR	Controles N=200 n (%)	Características clínicas al diagnóstico					
		Grosor tumoral		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤ 1 mm N=128 n (%)	> 1 mm N=103 n (%)	No N=173 n (%)	Si N=43 n (%)	No N=119 n (%)	Si N=21 n (%)
KIR inhibidores							
2DL1	199 (99)	128 (100)	102 (99)	172 (99)	43 (100)	118 (99)	21(100)
2DL2	119 (59)	70 (55)	64 (62)	98 (57)	29 (67)	73 (61)	11(52)
2DL3	182 (91)	115 (90)	83 (81)^{a,b}	155 (90)	29 (67)^{d,e}	104 (87)	17(81)
2DL5	82 (41)	64 (50)	56 (54)^c	86 (50)	30 (70)^{f,g}	67 (56)	7(33)
3DL1	194 (97)	121 (95)	98 (95)	165 (95)	39 (91)	110 (92)	21(100)
3DL2	200 (100)	128 (100)	103 (100)	173 (100)	43 (100)	119 (100)	21(100)
3DL3	200 (100)	128 (100)	103 (100)	173 (100)	43 (100)	119 (100)	21(100)
KIR activadores							
2DS1	62 (31)	45 (35)	42 (41)	62 (36)	21 (49)^h	48 (40)	6 (29)
2DS2	119 (59)	70 (55)	64 (62)	98 (57)	29 (67)	73 (61)	11(52)
2DS3	56 (28)	37 (29)	36 (35)	48 (28)	20 (46)^{i,j}	38 (32)	3 (14)
2DS4	194 (97)	121 (95)	98 (95)	165 (95)	39 (91)	110 (92)	21(100)
2DL4*	200 (100)	128 (100)	103 (100)	173 (100)	43 (100)	119 (100)	21(100)
2DS5	50 (25)	35 (27)	33 (32)	51 (29)	14 (33)	40 (34)	5 (24)
3DS1	71 (35)	48 (37)	42 (41)	65 (38)	21 (49)	51 (43)	7 (33)

^a, Grosor > 1 mm vs. controles (P=0.009, OR=0.41, IC 95%=0.21-0.81). ^b, Grosor > 1 mm vs. grosor ≤ 1 mm (P=0.046, OR=0.47, IC 95%=0.22-0.99). ^c, Grosor > 1 mm vs. controles (P=0.027, OR=1.71, IC 95%=1.06-2.77). ^d, Ulceración vs. controles (P=0.000034, OR=0.20, IC 95%=0.09-0.46). ^e, Ulceración vs. no ulceración (P=0.00025, OR=0.24, IC 95%=0.11-0.54). ^f, Ulceración vs. controles (P=0.001, OR=3.32, IC 95%=1.63-6.75). ^g, Ulceración vs. no ulceración (P=0.018, OR=2.33, IC 95%=1.14-4.78). ^h, Ulceración vs. controles (P=0.025, OR=2.12, IC 95%=1.09-4.15). ⁱ, Ulceración vs. controles (P=0.018, OR=2.24, IC 95%=1.14-4.39). ^j, Ulceración vs. no ulceración (P=0.018, OR=2.26, IC 95%=1.14-4.49). Los valores de *p* fueron determinados mediante un test de Fisher bilateral. Abreviaturas: GC, Ganglio centinela; KIR, killer immunoglobulin like receptors. * Receptor activador con potencial inhibidor.

En un análisis posterior, se estudió la frecuencia del gen KIR2DL3 en pacientes de los dos principales grupos histológicos de melanoma (MES y MN), en base a la presencia o ausencia de ulceración de la lesión primaria. Los resultados mostraron una disminución significativa de la frecuencia de KIR2DL3 en pacientes con presencia de ulceración en el grupo de MN con respecto al grupo control (54% vs. 91%, $P=0.001$, $OR=0.11$, $IC95\%=0.03-0.38$) (figura 33).

El estudio del gen KIR2DL3 en el grupo de pacientes con MES también reveló una disminución en la frecuencia de dicho gen en pacientes con ulceración respecto al grupo control, sin embargo la diferencia no alcanzó significación estadística (figura 33).

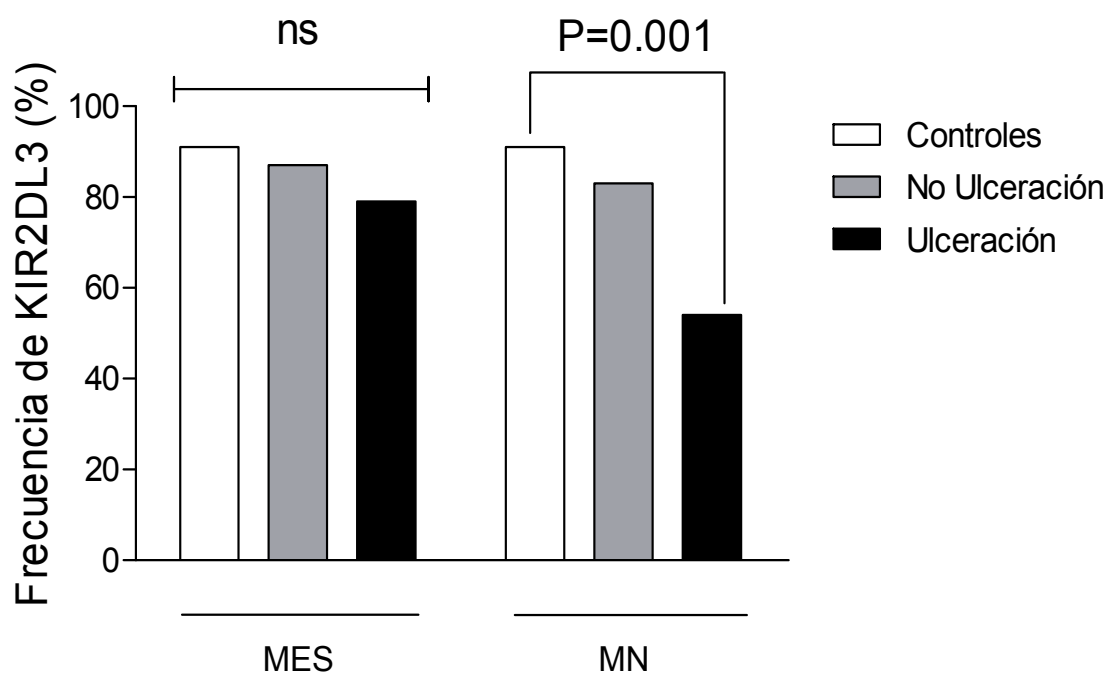


Figura 33. Frecuencia del gen KIR2DL3 en pacientes con MES y MN en presencia o ausencia de ulceración. La frecuencia de KIR2DL3 está representada para controles (barras blancas), pacientes sin ulceración (barras grises) y pacientes con ulceración (barras negras). Se representan los pacientes con MES (parte izquierda) y con MN (parte derecha). Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. Los valores de p se determinaron mediante el test exacto de Fisher bilateral.

Además, también se valoró la influencia de los genotipos KIR en el desarrollo y pronóstico del melanoma. Para ello, los individuos fueron agrupados en aquellos que presentan un genotipo AA (haplotipo A en homocigosis) y aquellos que presentan un genotipo Bx (presencia de un haplotipo B). Los resultados no revelaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con melanoma y el grupo control (figura 34A). Tampoco se observaron diferencias significativas al estudiar los pacientes de los dos grupos histológicos más representados (MES y MN) (figura 34A) o al segregar a los pacientes según las características clínicas al diagnóstico (figura 34B).

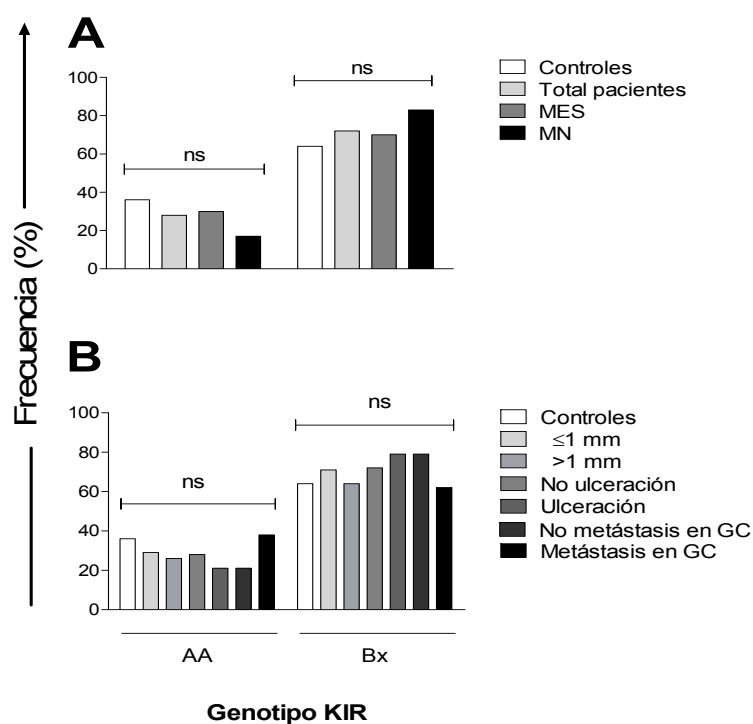


Figura 34. Frecuencia de los genotipos KIR en pacientes con melanoma en función del tipo histológico y de las características clínicas al diagnóstico, y de la población control. (A) frecuencia de los genotipos KIR en pacientes de melanoma y controles. (B) frecuencia de los genotipos KIR en pacientes con melanoma segregados en función de las características clínicas al diagnóstico y controles. Abreviaturas: AA, homocigotos para haplotipos A; Bx, homocigotos para haplotipos B y heterocigotos AB; MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela. Las comparaciones se realizaron mediante el test exacto de Fisher bilateral.

3. POLIMORFISMO DE LOS LIGANDOS DE LOS RECEPTORES KIR EN PACIENTES CON MELANOMA

3.1. Dimorfismo en posición 80 de los ligandos HLA-C en el melanoma cutáneo

El análisis del dimorfismo en posición 80 del locus HLA-C (grupos C1 y C2 de ligandos KIR), mostró diferencias en la frecuencia del genotipo C2C2 entre el grupo de pacientes con melanoma y el grupo control. Así, el genotipo C2C2 se encontró aumentado en el grupo de pacientes respecto al grupo control. Dicho aumento, alcanzó diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo de pacientes con MES con el grupo control (28% vs. 17%, $P=0.016$, $P_c=0.048$, $OR=1.89$, $IC\ 95\%=1.14-3.11$). Sin embargo, los genotipos C1C1 y C1C2, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control (figura 35A).

El estudio del dimorfismo HLA-C en los pacientes segregados en base a las características clínicas al diagnóstico, reveló un aumento significativo del genotipo C2C2 en el grupo de pacientes con metástasis en ganglio centinela respecto al grupo control y al grupo de pacientes sin metástasis (57% vs. 17% y 18%; $P=0.00016$, $P_c=0.00048$, $OR=7.07$, $IC\ 95\%=2.69-18.58$ y $P=0.00045$, $P_c=0.0013$, $OR=5.88$, $IC\ 95\%=2.21-15.67$, respectivamente) (figura 35B). Sin embargo, los resultados obtenidos al estudiar la distribución del genotipo C2C2 en función del grosor y la ulceración de la lesión primaria no revelaron diferencias significativas. El estudio de la distribución de los genotipos C1C1 y C1C2 en función de las características clínicas al diagnóstico, no mostró diferencias significativas (figura 35B).

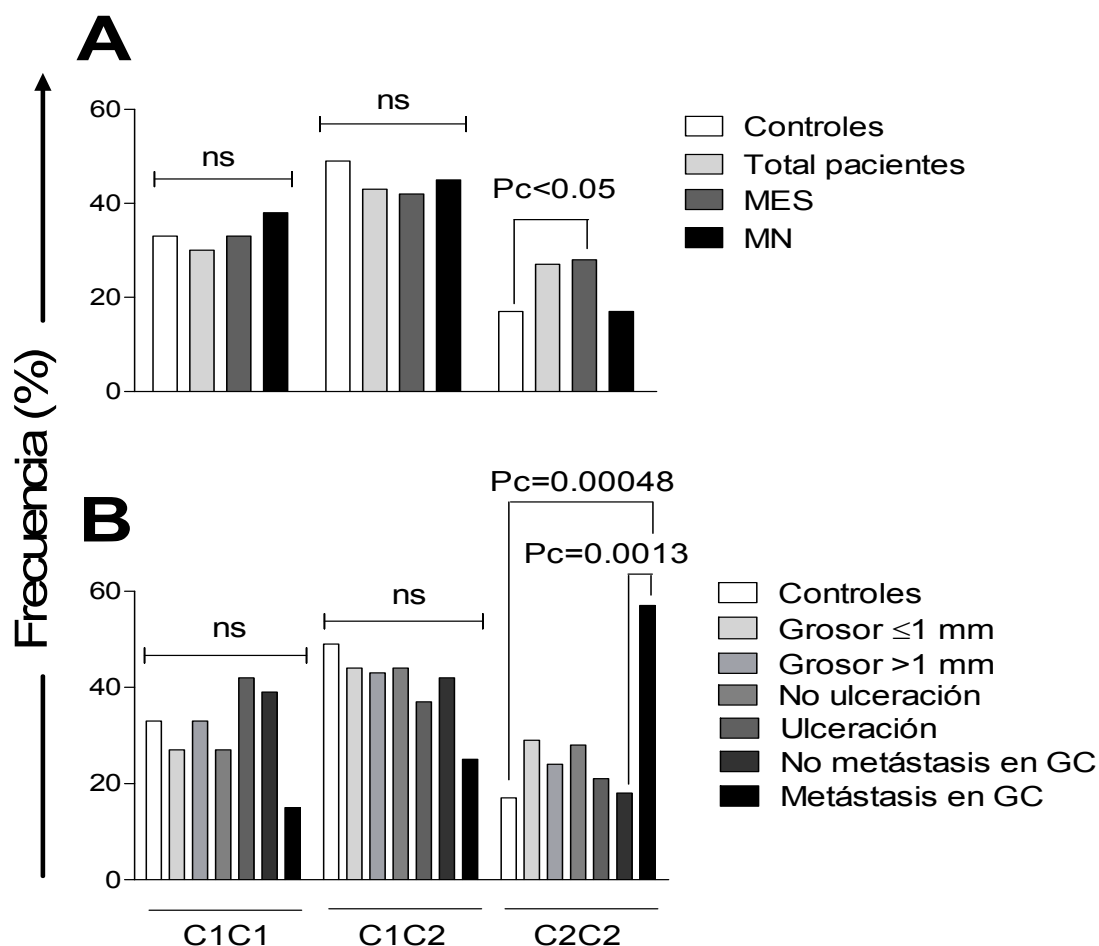


Figura 35. Frecuencia de los genotipos HLA-C en pacientes de melanoma, pacientes de melanoma segregados en función de las características clínicas al diagnóstico, y controles. (A) Frecuencia de los genotipos HLA-C en pacientes con melanoma y controles. (B) Frecuencia de los genotipos HLA-C en pacientes con melanoma segregados en función de las características clínicas al diagnóstico y controles. El valor de la p fue determinado mediante un test de Fisher bilateral. Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela.

3.2. Epítomos Bw4 y Bw6 en pacientes con melanoma cutáneo

El estudio de los epítomos Bw4 y Bw6 en pacientes con melanoma y controles, no mostró diferencias significativas (figura 36).

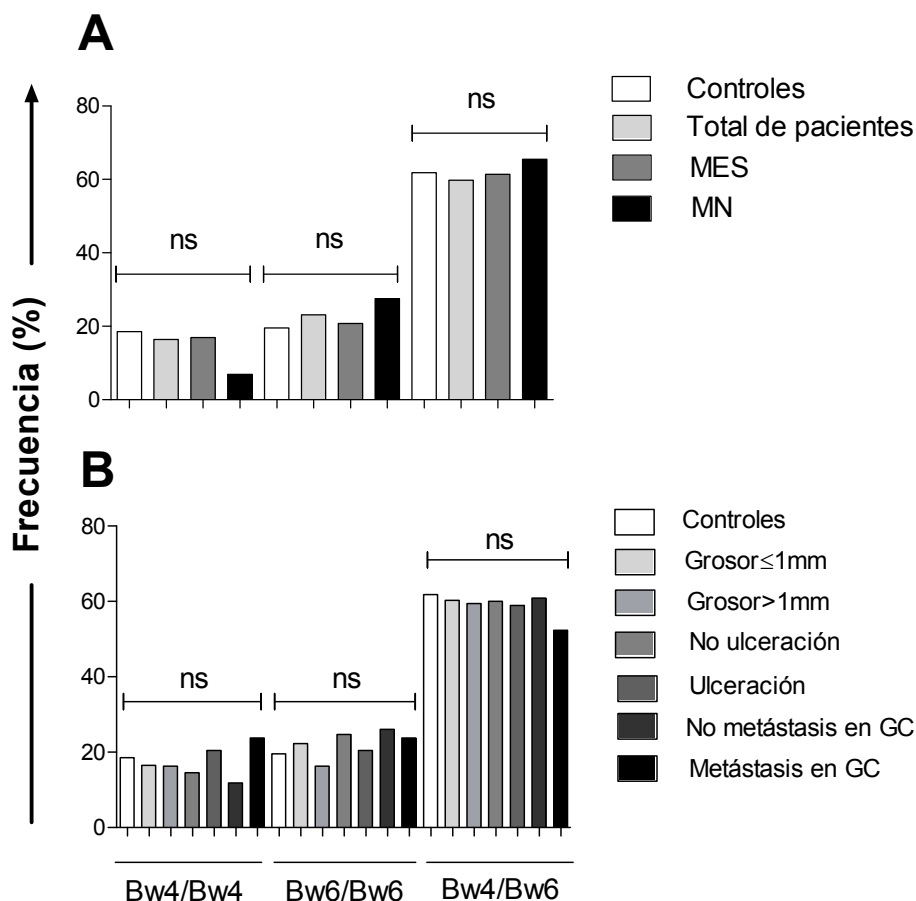


Figura 36. Análisis de los epítomos Bw4/Bw6 en pacientes con melanoma y controles. (A) epítomos Bw4/Bw6 en pacientes con melanoma y controles. (B) epítomos Bw4/Bw6 en pacientes con melanoma segregados en función de las características clínicas al diagnóstico y controles. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante un test de Fisher bilateral. Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela.

Posteriormente, se analizaron los ligandos HLA-Bw4 para el receptor inhibidor KIR3DL1 en el contexto de la presencia de isoleucina (Bw4 Ile) o treonina (Bw4 Thr) en posición 80 (figura 37). Dicho estudio no mostró diferencias significativas al comparar los grupos de pacientes con melanoma con el grupo control.

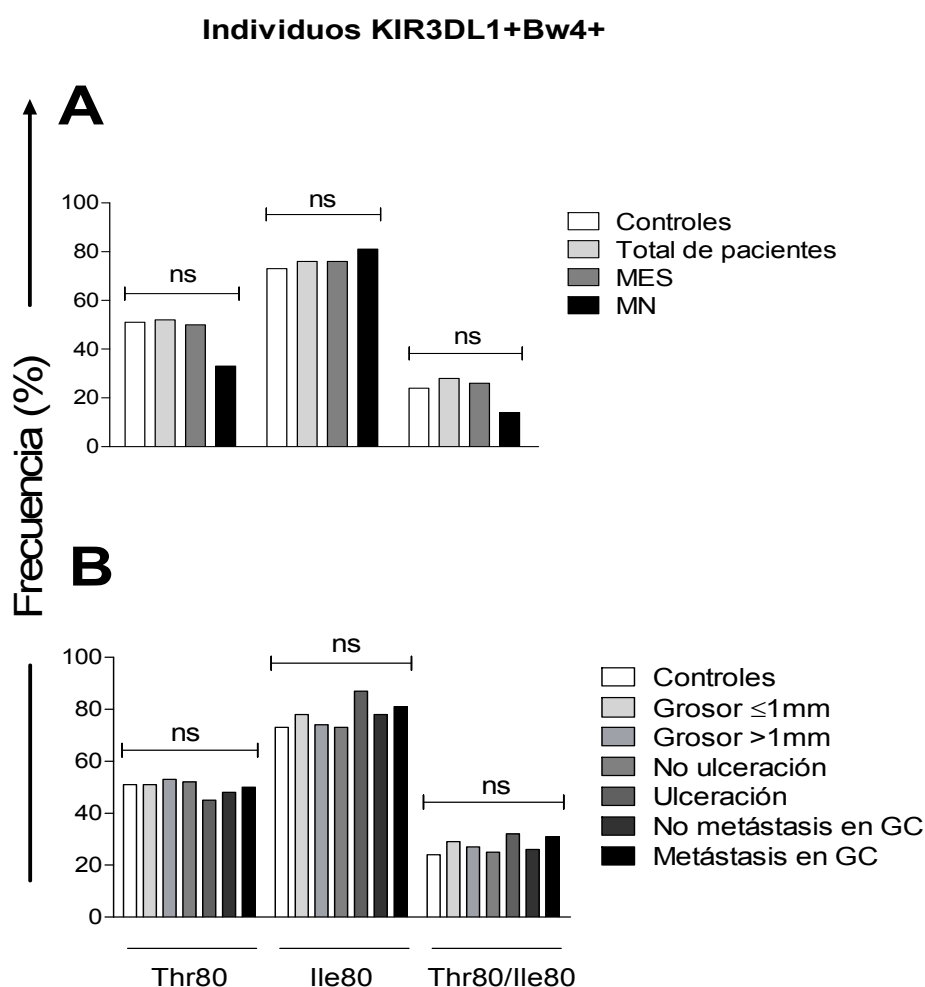


Figura 37. Análisis del dimorfismo en posición 80 del ligando HLA-Bw4 en pacientes con melanoma y controles. (A) Dimorfismo del ligando HLA-Bw4 en pacientes con melanoma y controles. (B) Dimorfismo Bw4 en pacientes con melanoma segregados en función de las características clínicas al diagnóstico y controles. Las comparaciones fueron realizadas mediante un test de Fisher bilateral. Abreviaturas: Thr80, Treonina 80; Ile80, Isoleucina 80; MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela. Nota: Todas las comparaciones se hicieron entre individuos KIR3DL1+.

4. INFLUENCIA DE LOS PARES KIR/LIGANDO HLA-C EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y PRONÓSTICO DEL MELANOMA

La frecuencia disminuida del gen KIR2DL3 en el grupo de pacientes con MN anteriormente descrita (ver tabla 34), nos llevó a examinar si la combinación entre el gen KIR2DL3 y sus ligandos HLA-C específicos (grupo C1) estaba asociada con un riesgo disminuido de desarrollar melanoma. Como se puede observar en la figura 38A, la frecuencia del genotipo KIR2DL3⁺/C1⁺ se encontraba significativamente disminuída en el grupo de pacientes de melanoma con respecto al grupo control (63% vs. 75%; P=0.009, Pc=0.036; OR=0.56; IC95%=0.37-0.86). Dicha disminución fue también observada en los grupos de pacientes con MES y MN respecto al grupo control, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

En un análisis posterior, se evaluó la posible asociación entre el genotipo KIR3DL1⁺/C1⁺ y las características clínicas al diagnóstico (figura 38B-D). Los resultados revelaron una disminución en la frecuencia de la combinación KIR2DL3⁺/C1⁺ en pacientes de melanoma con un grosor tumoral ≤ 1 mm y > 1 mm respecto al grupo control, aunque dicha disminución no alcanzó la significación estadística (63% y 62% vs. 75%; P=0.026, Pc>0.05; OR=0.57; IC95%=0.35-0.93 y P=0.024, Pc>0.05; OR=0.55; IC95%=0.33-0.91, respectivamente) (figura 38B). Además, también se observó una frecuencia reducida del genotipo KIR2DL3⁺/C1⁺ en pacientes sin y con ulceración en comparación con el grupo control (64% y 56% vs. 75%; P=0.018, Pc>0.05; OR=0.58; IC95%0.37-0.91 y P=0.015, Pc>0.05; OR=0.42; IC95%=0.21-0.83, respectivamente) (figura 38C).

Por otro lado, se observó una frecuencia significativamente menor de individuos portadores del genotipo KIR2DL3⁺/C1⁺ en el grupo de pacientes con metástasis en ganglio centinela en comparación con el grupo control y con el grupo de pacientes sin metástasis (29% vs. 75% y 72%, P=0.000034, Pc=0.0001, OR=0.13, IC95%=0.049-0.36 y P=0.00025, Pc=0.001, OR=0.15, IC95%=0.05-0.43, respectivamente) (figura 38D).

Además, también se investigó el efecto de la ausencia de KIR2DL3 en presencia de ligandos del grupo C1 (genotipo KIR2DL3⁻/C1⁺), en el desarrollo y pronóstico del melanoma cutáneo. En este punto, es importante destacar que, debido a que KIR2DL3 y KIR2DL2 se comportan como alelos (Parham 2004), los individuos negativos para el gen KIR2DL3 son homocigotos para el gen KIR2DL2.

Como se muestra en la figura 38A, la frecuencia del genotipo KIR2DL3⁻/C1⁺, se encontraba aumentada en pacientes con MN respecto al grupo control, aunque dicho aumento no alcanzó la significación estadística (21% vs. 7%; P=0.034, P_c>0.05; OR=3.22; IC95%=1.14-9.11). También se observó un aumento significativo de individuos portadores del genotipo KIR2DL3⁻/C1⁺ en el grupo de pacientes con ulceración en comparación con el grupo control y con el grupo de pacientes sin ulceración (23% vs. 7% y 8%; P=0.005, P_c=0.02, OR=3.74, IC95%=1.55-9.03 y P=0.011, P_c=0.044, OR=3.44, IC95%=1.41-8.41, respectivamente) (figura 38C). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al estudiar la combinación KIR2DL3⁻/C1⁺ en los grupos de pacientes segregados en base al grosor tumoral (figura 38B) y a la presencia de metástasis en ganglio centinela (figura 38D).

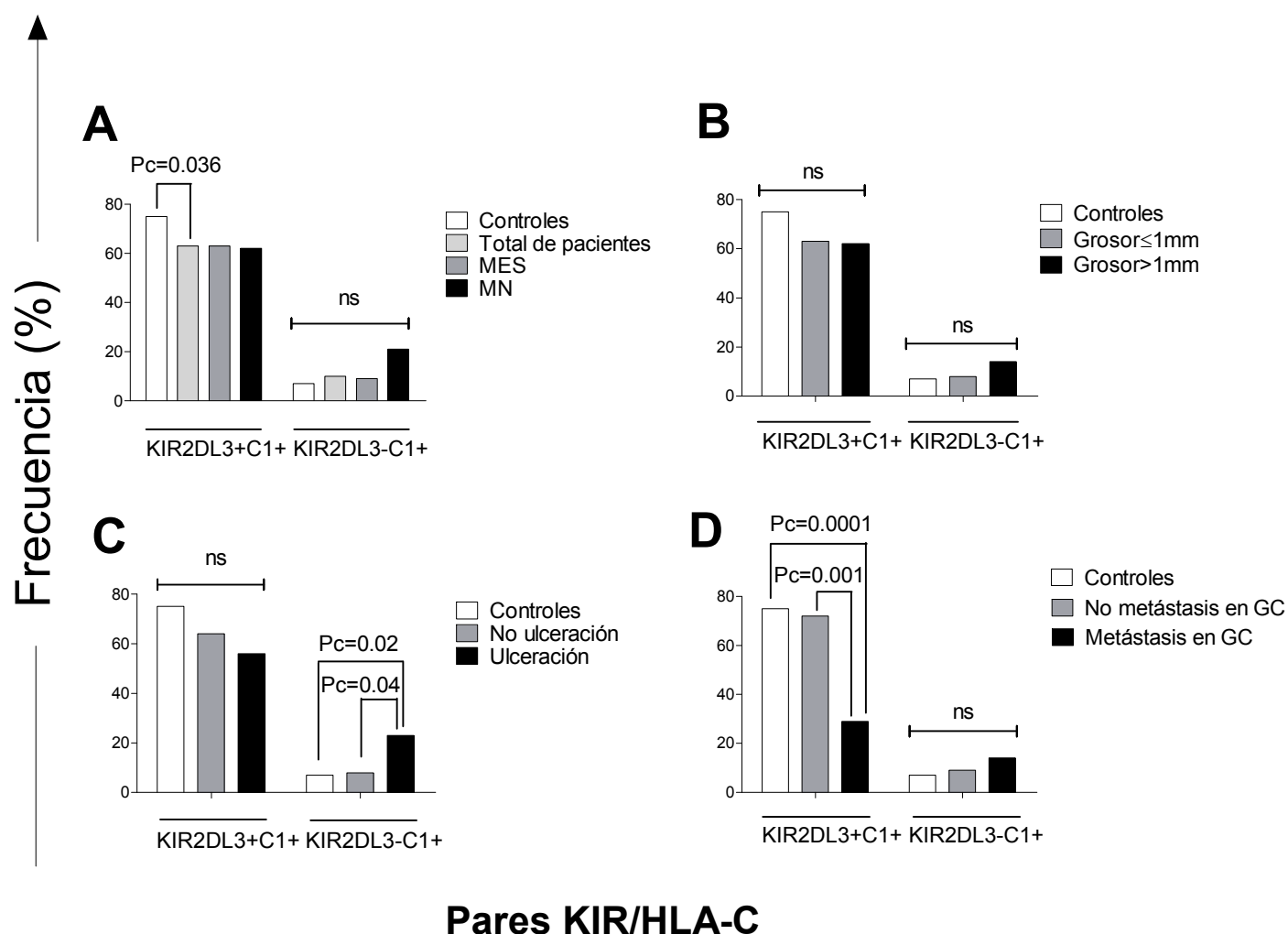


Figura 38. Efecto de la presencia o ausencia de KIR2DL3 en combinación con sus ligandos HLA-C del grupo C1 sobre la susceptibilidad al melanoma y las características clínicas al diagnóstico. (A) frecuencia de los genotipos KIR2DL3⁺C1⁺ y KIR2DL3⁻C1⁺ en pacientes de melanoma según el subtipo histológico y en el grupo control. (B-D) frecuencia de los genotipos KIR2DL3+C1+ y KIR2DL3-C1+ en los distintos grupos de pacientes con melanoma según las características clínicas al diagnóstico (grosor, ulceración y presencia o no de metástasis en GC) y en el grupo control. Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela. El valor de *p* se determinó mediante el test exacto de Fisher bilateral.

Posteriormente, se realizó un análisis en pacientes con diagnóstico de MES o de MN, con el fin de investigar la influencia del genotipo KIR2DL3⁺/C1⁺ en la protección al desarrollo de metástasis en GC, así como del genotipo KIR2DL3⁻/C1⁺ en la susceptibilidad al desarrollo de ulceración en estos dos tipos histológicos de melanoma (figura 39). Los resultados mostraron una frecuencia significativamente disminuida del genotipo KIR2DL3⁺/C1⁺ en pacientes con diagnóstico de MES o MN que presentaban metástasis en GC con respecto al grupo control (36% y 0% vs. 75%; P=0.003, Pc=0.012, OR=0.18, IC95%=0.06-0.58 y P=0.005, Pc=0.02, OR=0.25, IC95%=0.20-0.32, respectivamente), y de los pacientes con MN que presentaban metástasis en GC con respecto a aquellos que no presentaban metástasis en GC (0% vs. 92%, P=0.002, Pc=0.008, OR=0.08, IC95%=0.01-0.51, respectivamente) (figura 39A).

Por otro lado, se observó un incremento en el número de individuos con genotipo KIR2DL3⁻/C1⁺ tanto en el grupo de pacientes con MES como en el grupo de pacientes con MN que presentaban ulceración de la lesión primaria respecto al grupo control y al grupo de pacientes que no presentaba ulceración, sin embargo, dicho incremento no alcanzó la significación estadística (figura 39B).

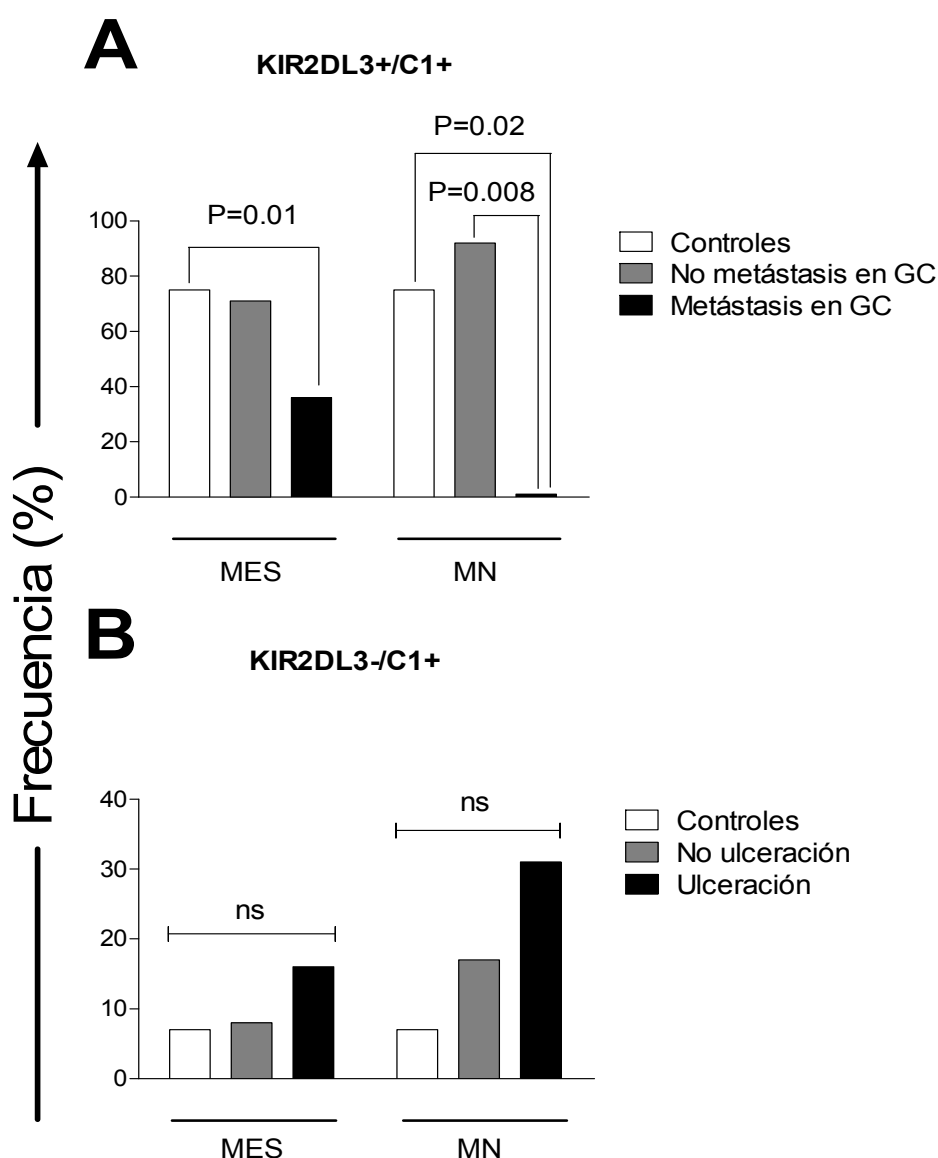


Figura 39. Influencia de la presencia o ausencia de KIR2DL3 en combinación con sus ligandos HLA-C del grupo C1 sobre las características clínicas al diagnóstico de los pacientes con MES y MN. (A) frecuencia del genotipo KIR2DL3+/C1+ en pacientes con ausencia o presencia de metástasis en GC. (B) frecuencia del genotipo KIR2DL3-/C1+ en pacientes con ausencia o presencia de ulceración en la lesión primaria. Se muestra a los pacientes con diagnóstico de MES (parte izquierda) y de MN (parte derecha). Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela. Los valores de p se determinaron mediante el test exacto de Fisher bilateral.

El análisis de regresión logística multivariante confirmó las asociaciones observadas anteriormente entre KIR2DL3 y protección a MN y al desarrollo de ulceración, así como la asociación del par KIR2DL3/C1 con protección al desarrollo de melanoma, particularmente de melanoma de extensión superficial, y al desarrollo de metástasis en GC (tabla 36).

Genotipo		OR	IC 95%	P
Efecto en la protección a melanoma				
Total de pacientes	<i>KIR2DL3</i>	0.90	0.44-1.86	0.78
	<i>KIR2DL3/C1</i>	0.59	0.36-0.97	0.04
Pacientes con MES	<i>KIR2DL3</i>	1.12	0.51-2.47	0.77
	<i>KIR2DL3/C1</i>	0.54	0.32-0.92	0.02
Pacientes con MN	<i>KIR2DL3</i>	0.21	0.05-0.90	0.03
	<i>KIR2DL3/C1</i>	1.27	0.35-4.60	0.71
Efecto en función de las características clínicas al diagnóstico				
Grosor tumoral > 1 mm				
Total de pacientes	<i>KIR2DL3</i>	0.60	0.25-1.46	0.26
	<i>KIR2DL5</i>	1.52	0.72-3.20	0.27
	<i>KIR2DS1</i>	1.15	0.59-2.21	0.68
	<i>KIR2DS3</i>	0.86	0.45-1.65	0.65
	<i>KIR2DL3/C1</i>	0.70	0.37-1.33	0.28
Presencia de ulceración				
Total de pacientes	<i>KIR2DL3</i>	0.26	0.08-0.87	0.03
	<i>KIR2DL5</i>	2.56	0.89-7.31	0.08
	<i>KIR2DS1</i>	1.08	0.46-2.53	0.87
	<i>KIR2DS3</i>	0.96	0.40-2.32	0.94
	<i>KIR2DL3/C1</i>	1.05	0.36-3.01	0.93
Presencia de metástasis en GC				
Total de pacientes	<i>KIR2DL3</i>	1.25	0.32-4.83	0.75
	<i>KIR2DL5</i>	0.91	0.20-4.16	0.91
	<i>KIR2DS1</i>	1.21	0.28-5.13	0.80
	<i>KIR2DS3</i>	0.31	0.07-1.46	0.14
	<i>KIR2DL3/C1</i>	0.11	0.04-0.32	0.00006

Tabla 36. Análisis de regresión logística multivariante del efecto de los receptores KIR2D y del par KIR2DL3/C1 en la protección al desarrollo de melanoma y las características clínicas al diagnóstico. Efecto de KIR2DL3, KIR2DL5, KIR2DS3 y KIR2DL3/C1 sobre el riesgo de desarrollar melanoma y sobre las características clínicas al diagnóstico. En todos los casos las comparaciones se realizaron entre cada uno de los grupos de pacientes y el grupo control. Abreviaturas: OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; GC, ganglio centinela.

En vista de los resultados obtenidos anteriormente para el genotipo C2C2 (ver figura 35), también se evaluó el efecto de los genes KIR2DL1 y KIR2DS1 en función de la dosis de sus ligandos HLA-C del grupo C2 en la susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis en GC. Dicho análisis mostró, que los individuos con genotipo KIR2DL1⁺/2DS1⁻/C2C2 tienen un riesgo elevado de desarrollar melanoma ($\chi^2=5.61$; $P>0.05$), que alcanzó significación estadística en el caso del grupo de pacientes con MES ($\chi^2=6.73$; $P=0.03$) (figura 40A-B). También se observó que los pacientes con genotipo KIR2DL1⁺/2DS1⁻/C2C2 tienen un riesgo significativamente aumentado de desarrollar metástasis en GC ($\chi^2=14.84$; $P=0.001$), particularmente aquellos pacientes con diagnóstico de MES ($\chi^2=13.57$; $P=0.001$) (figura 40C-D), en comparación con los individuos que son portadores de los genotipos KIR2DL1⁺/2DS1⁻/C1C2 o KIR2DL1⁺/2DS1⁻/C1C1. Así, el porcentaje de individuos portadores del genotipo KIR2DL1⁺/2DS1⁻/C2C2 fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con MES que en el grupo control (20% vs. 11%, $P=0.04$, OR=1.91, IC95%=1.07-3.42). Además, el genotipo KIR2DL1⁺/2DS1⁻/C2C2 estaba significativamente aumentado en el grupo de pacientes que desarrollaron metástasis en ganglio centinela en comparación con el grupo control (43% vs. 11% y 11%, $P=0.001$, OR=5.77, IC95 % =2.19-15.18) (figura 40C) y con el grupo de pacientes sin metástasis ($P=0.001$, OR=6.11, IC95 % =2.16-17.28), y en el grupo de pacientes con MES que presentaba metástasis en GC respecto al grupo control (50% vs. 11%, $P=0.001$, OR=7.7, IC95 % =2.48-23.92) (figura 40D). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre el genotipo KIR2DL1⁺/2DS1⁺/C2C2 y el riesgo de desarrollar melanoma o el pronóstico del mismo (figura 41).

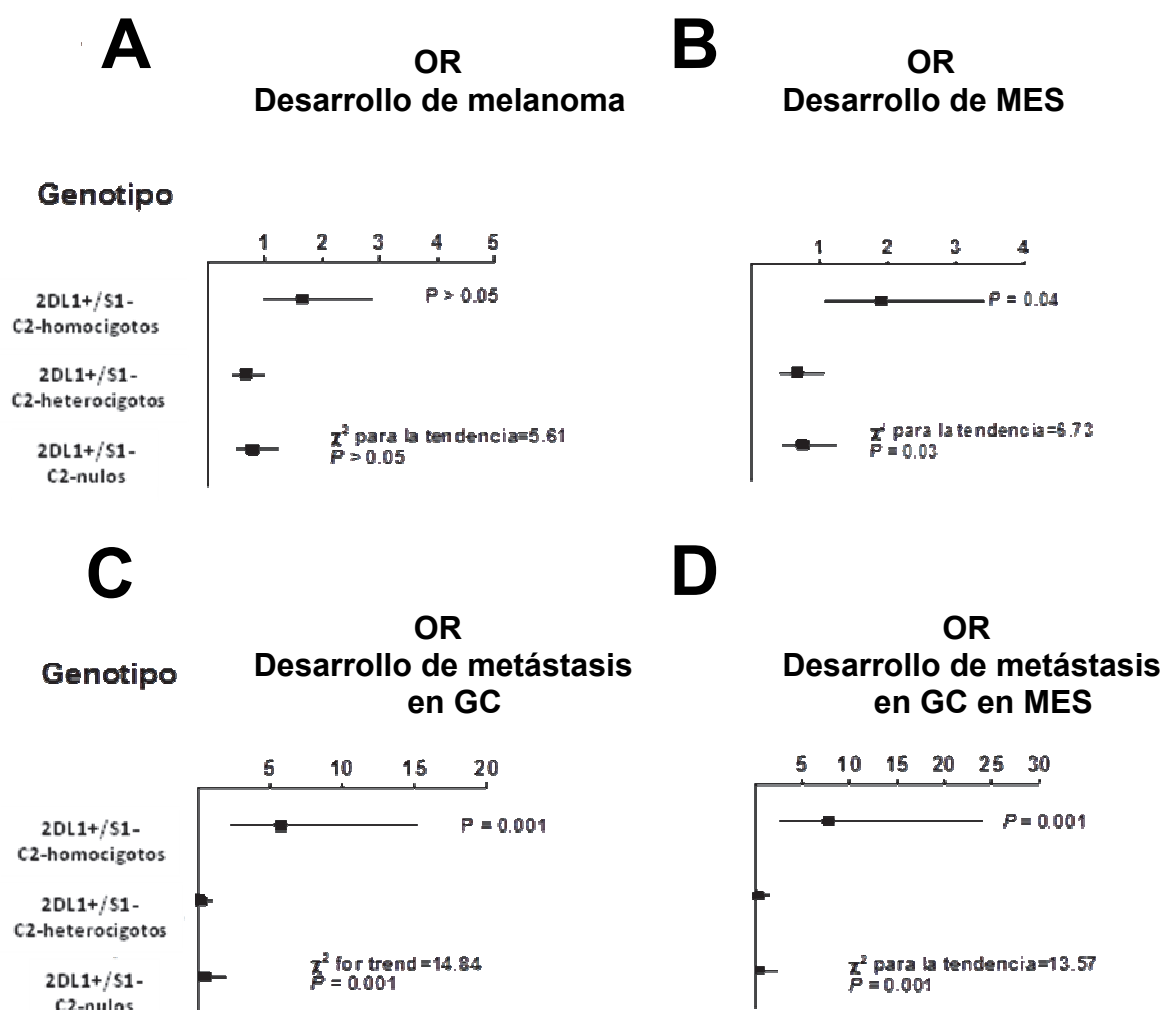


Figura 40. Influencia del genotipo KIR2DL1+/2DS1-/C2C2 en la susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis en ganglio centinela. Los individuos KIR2DL1+/S1- se representan agrupados según el genotipo HLA-C, en individuos 2DL1+/S1-/C2C2, 2DL1+/S1-/C1C2 y 2DL1+/S1-/C1C1. Se representan las comparaciones entre el total de pacientes de melanoma (A), los pacientes con MES (B), los pacientes con metástasis en GC (C) y los pacientes con MES que presentan metástasis en GC (D) con el grupo control. Los valores de p y OR para la susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis en GC fueron calculados con un IC95% a partir de tablas de contingencia 2x2, utilizando el test exacto de Fisher. También se muestra el resultado del test Chi-cuadrado para la tendencia en función del genotipo HLA-C. Abreviaturas: GC, ganglio centinela; MES, melanoma de extensión superficial; OR, odds ratio.

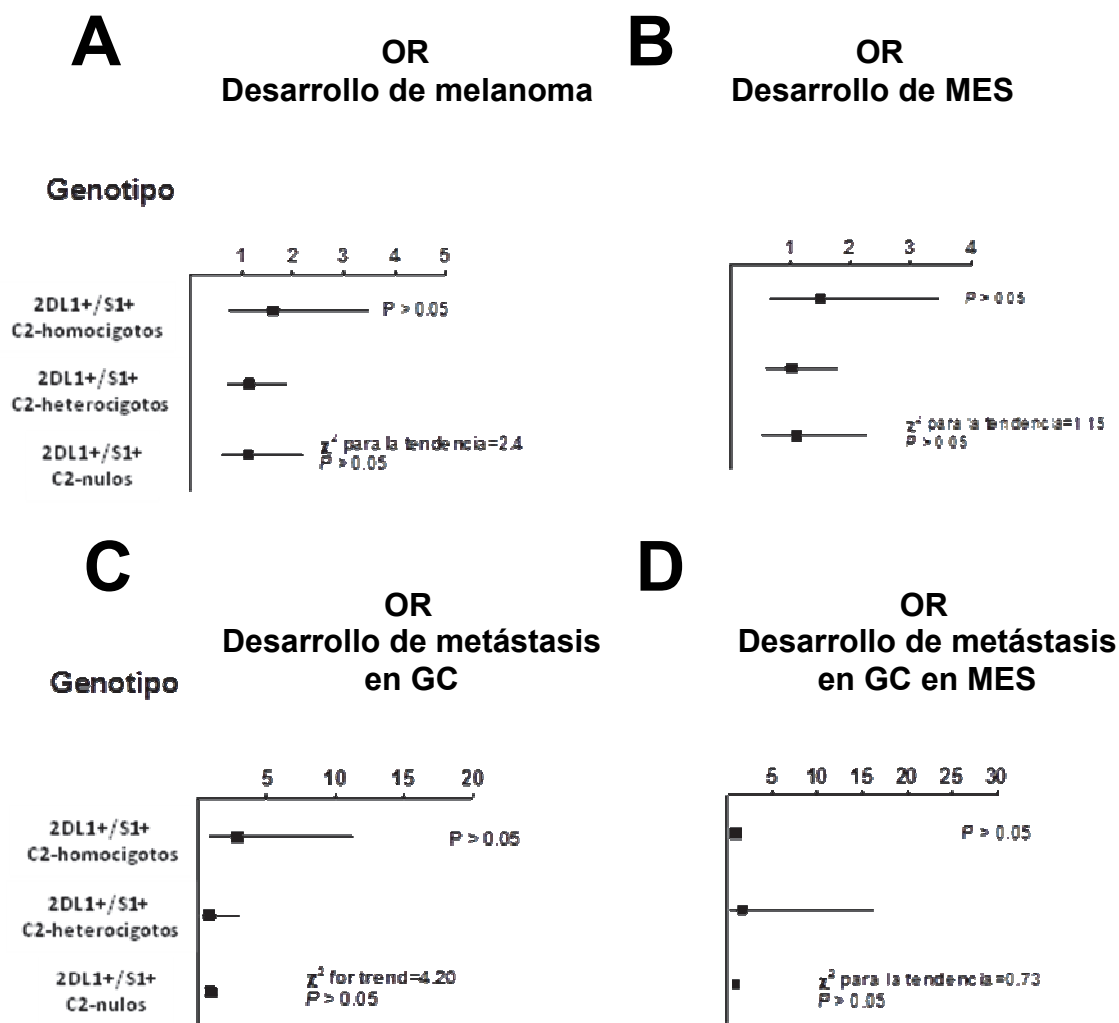


Figura 41. Influencia del genotipo KIR2DL1+/2DS1+/C2C2 en la susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis en ganglio centinela. Los individuos KIR2DL1+/S1+ se representan agrupados según el genotipo HLA-C, en individuos 2DL1+/S1+/C2C2, 2DL1+/S1+/C1C2 y 2DL1+/S1+/C1C1. Se representan las comparaciones entre el total de pacientes de melanoma (A), los pacientes con MES (B), los pacientes con metástasis en GC (C) y los pacientes con MES que presentan metástasis en GC (D), con respecto al grupo control. Los valores de p y OR para la susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis en GC fueron calculados con un IC95% a partir de tablas de contingencia 2x2 utilizando el test exacto de Fisher. También se muestra el resultado del test Chi-cuadrado para la tendencia en función del genotipo HLA-C. Abreviaturas: GC, ganglio centinela; MES, melanoma de extensión superficial; OR, odds ratio.

5. LINFOCITOS T CD8+ y CÉLULAS NK QUE EXPRESAN RECEPTORES KIR EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA

Se estudiaron las poblaciones de células NK y linfocitos TCD8+ que expresan CD158a/h (KIR2DL1/KIR2DS1) y CD158b/j (KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2) en sangre periférica de un grupo de 35 pacientes diagnosticados de melanoma y 24 individuos sanos compatibles en edad y sexo. Dentro del grupo de pacientes, 27 fueron clasificados como estadio I-II, 3 como estadio III y en 5 de ellos no se obtuvo información sobre el estadio clínico. Respecto al genotipo HLA-C, 9 de los pacientes presentaban un genotipo homocigoto C1C1, 7 un genotipo homocigoto C2C2 y 17 un genotipo heterocigoto C1/C2. En la tabla 37 se recogen las características clínicas, demográficas y el genotipo HLA-C de los 35 pacientes estudiados.

Tabla 37. Datos demográficos, Características clínicas y genotipo HLA-C de los pacientes incluidos en el estudio de poblaciones celulares que expresan receptores KIR.

Pac. (n=35)	Edad/ Sexo	Genotipo HLA-C	Estadio clínico(*)	Pac. (n=35)	Edad/ Sexo	Genotipo HLA-C	Estadio clínico(*)
1	42/M	C1/C1	I-II	19	63/H	C1/C2	I-II
2	24/M	C1/C2	I-II	20	68/M	C1/C1	-
3	68/H	C1/C2	I-II	21	51/M	C2/C2	I-II
4	56/M	C2/C2	I-II	22	48/M	C1/C2	I-II
5	26/M	C1/C2	I-II	23	35/M	C2/C2	I-II
6	68/M	C1/C1	I-II	24	67/H	C1/C2	I-II
7	49/M	C2/C2	-	25	53/H	C1/C2	I-II
8	45/M	C1/C1	I-II	26	57/H	-	-
9	41/H	C1/C1	I-II	27	60/H	C1/C1	I-II
10	58/M	C1/C2	I-II	28	35/H	C1/C2	I-II
11	78/M	C1/C2	I-II	29	69/H	C1/C2	I-II
12	54/M	C1/C2	I-II	30	56/H	C1/C2	I-II
13	61/M	C1/C2	-	31	71/M	-	I-II
14	52/M	C2/C2	I-II	32	61/H	C2/C2	I-II
15	50/M	C1/C1	I-II	33	66/H	C1/C1	III
16	64/M	C1/C1	III	34	47/H	C2/C2	III
17	39/H	C1/C2	-	35	60/M	C1/C2	I-II
18	43/H	C1/C2	I-II				

*Estadios clínicos según la AJCC; Abreviaturas, Pac, Pacientes; H, hombre; M, mujer.

El número de linfocitos TCD8+ totales, linfocitos TCD8+ CD158a/h+ y CD158b/j+ fue similar en el grupo de pacientes y el grupo control (figura 42A). El análisis de las células NK CD56+ reveló un aumento en el número absoluto de células NK en el grupo de pacientes con respecto al grupo control, que fue significativo en el caso de las células NK CD158a/h+ (P=0.036). Sin embargo, el número absoluto de células NK CD158b/j+ fue similar en el grupo de pacientes y el grupo control (figura 42B).

Al realizar el estudio diferenciando la población de células NK con una expresión intermedia de CD56 (CD56^{dim}) y la población de células NK con una expresión alta de CD56 (CD56^{bright}), se observó un aumento en el número absoluto de células NK CD56^{dim} en el grupo de pacientes con respecto al grupo control, que fue significativo en el caso de las células NK CD56^{dim} CD158a/h+ (P=0.037). Sin embargo, el número absoluto de células NK CD56^{dim} CD158b/j+ fue similar en el grupo de pacientes y en el grupo control (figura 43A).

El análisis de la expresión de las moléculas CD158a/h y CD158b/j en la población de células NK CD56^{bright} no reveló diferencias significativas al comparar el grupo de pacientes con el grupo control (figura 43B). Como puede observarse en la figura 42B, las células NK CD56^{bright} prácticamente no expresan las moléculas CD158a/h y CD158b/j, a diferencia de las células NK CD56^{dim} que son las que expresan estas moléculas mayoritariamente.

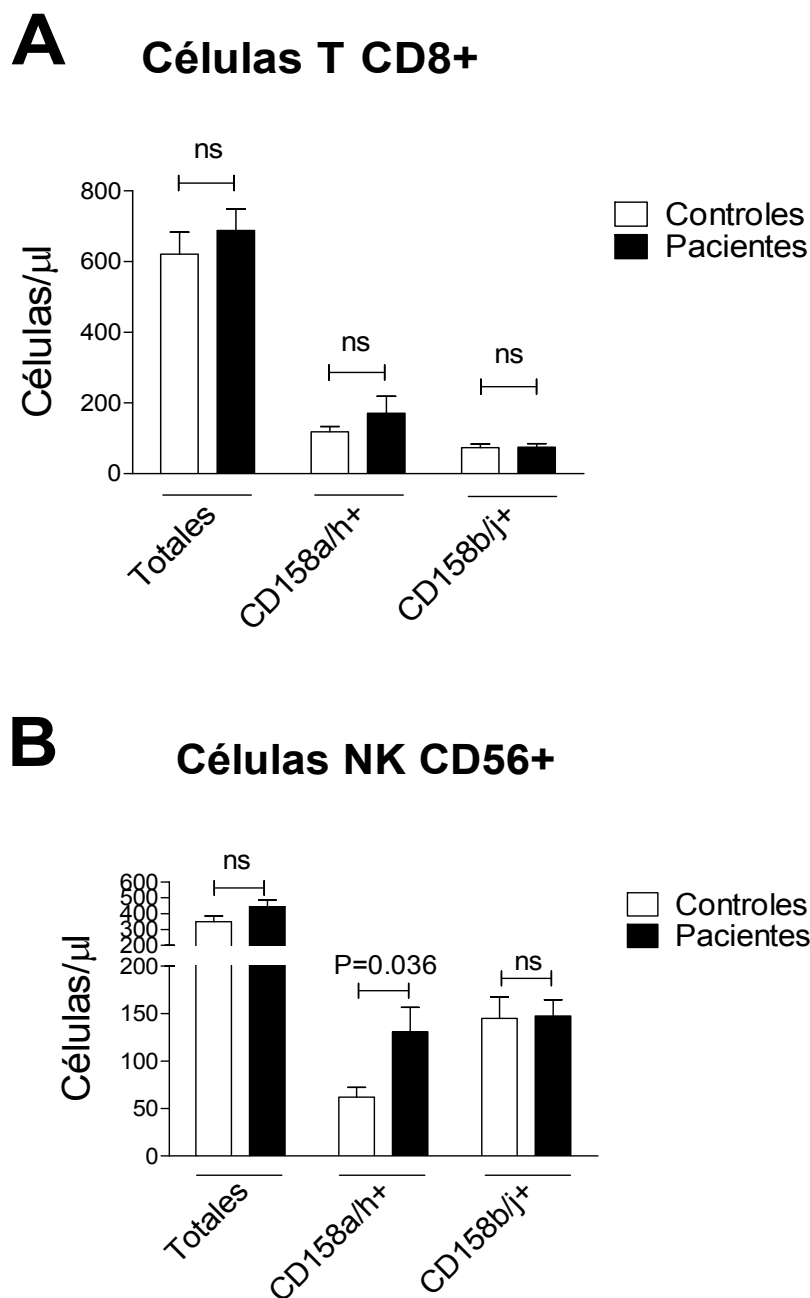
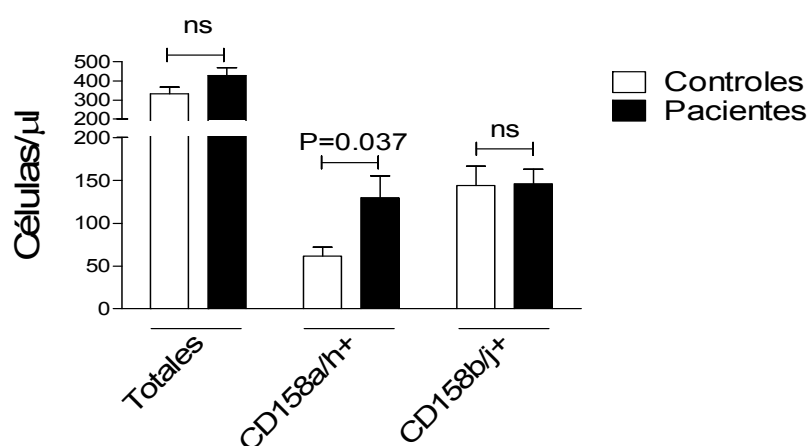


Figura 42. Células T CD8+ y NK CD56+ totales en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles de acuerdo a la expresión de CD158a/h y CD158b/j. (A) Células T CD8+ positivas para CD158a/h y CD158b/j. (B) Células NKCD56+ positivas para CD158a/h y CD158b/j (B). El número de células se representa como la media \pm SEM. Controles (n=24); Pacientes (n=35). Los valores de p fueron determinados mediante el test ANOVA de una vía. Abreviaturas: ns, no significativo.

A Células NK CD56^{dim}



B Células NK CD56^{bright}

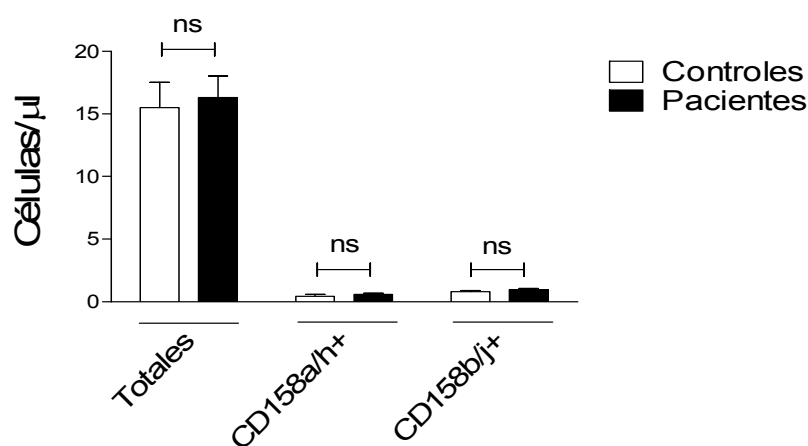


Figura 43. Células NK CD56^{dim} y NK CD56^{bright} en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles de acuerdo a la expresión de CD158a/h y CD158b/j. (A) Células NKCD56^{dim} CD158a/h+ y CD158b/j+. (B) Células NKCD56^{bright} CD158a/h+ y CD158b/j+ (B). El número de células se representa como la media \pm SEM. Controles (n=24); Pacientes (n=35). Los valores de la *p* fueron determinados mediante el test ANOVA de una vía. Abreviaturas: ns, no significativo.

Posteriormente, se realizó un estudio agrupando a los pacientes con melanoma en aquellos que no presentan metástasis en ganglio centinela (estadio I-II) y aquellos que presentan metástasis en ganglio centinela (estadio III). El estudio de células NK reveló un incremento en el número absoluto de células NKCD56^{dim} CD158a/h+ en pacientes en estadio I-II con respecto a los controles y a los pacientes en estadio III, aunque dicho aumento no alcanzó la significación estadística (figura 44). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número absoluto de células NKCD56^{dim} CD158b/j+ al comparar ambos grupos de pacientes con el grupo control (figura 44).

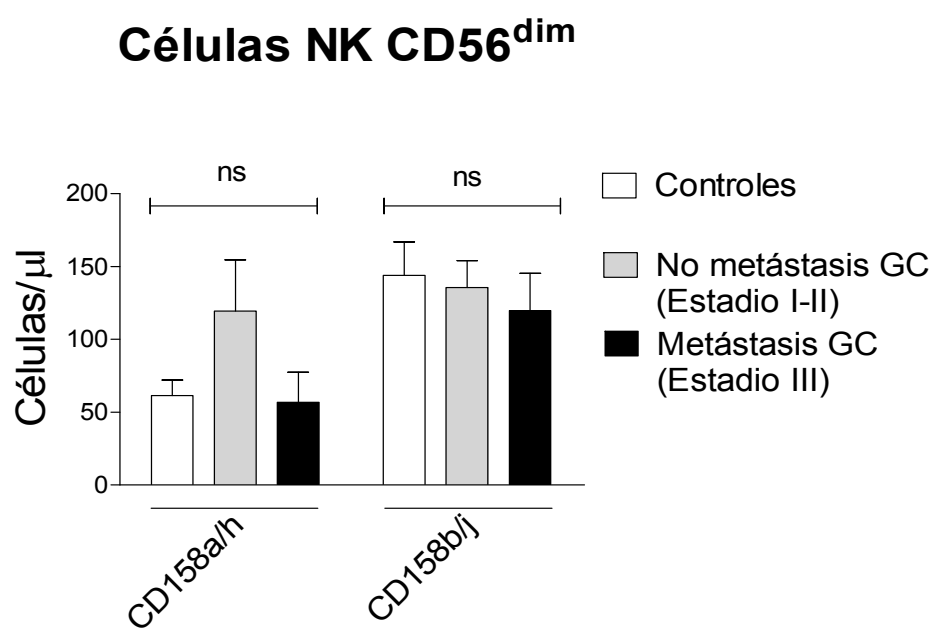


Figura 44. Poblaciones de células NK CD158a/h+ y NK CD158b/j+ en sangre periférica de pacientes con melanoma según su estadio clínico al diagnóstico y controles. Células NK CD158a/h+ y NK CD158b/j+ en pacientes en estadio I-II, estadio III e individuos sanos; controles (n=24); no metástasis en GC (Estadio I-II) (n=24); metástasis en GC (n=3). Abreviaturas: ns, no significativo; GC, ganglio centinela. El n° de células se representa como la media \pm SEM. Los valores de *p* fueron determinados mediante el test de Kruskal-Wallis.

El incremento de células NK CD56^{dim} CD158a/h+ (KIR2DL1/2DS1) previamente descrito en pacientes con melanoma, nos llevó a realizar un análisis de las diferentes subpoblaciones de células NK CD56^{dim} que expresan las combinaciones de receptores KIR2DL1+/2DS1-, KIR2DL1+/2DS1+, KIR2DL1-/2DS1+ y KIR2DL1-/2DS1+/2DL2/3/S2-/3DL1-. Dicho análisis reveló un aumento significativo de células NKCD56^{dim} KIR2DL1-/2DS1+ (P=0.047) y KIR2DL1-/2DS1+/2DL2/3/S2-/3DL1- (P=0.021) en pacientes con melanoma respecto al grupo control (figura 45). También se observó un aumento de células NKCD56^{dim} KIR2DL1+/2DS1- y KIR2DL1+/2DS1+ en el grupo de pacientes respecto al grupo control, aunque dicho aumento no alcanzó la significación estadística.

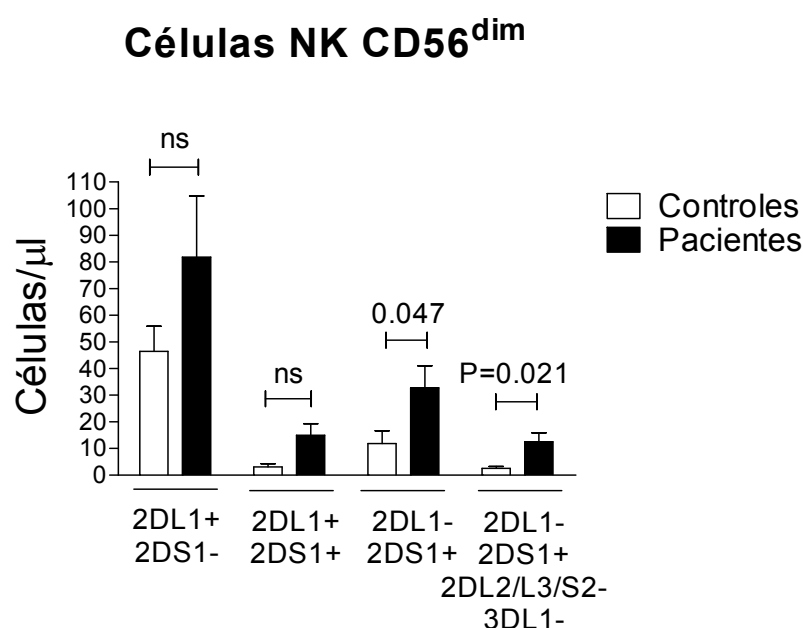


Figura 45. Poblaciones de células NK CD56^{dim} que expresan CD158a/h en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles. Células NKCD56^{dim} KIR2DL1+/2DS1- en pacientes (n=33) y controles (n=22), KIR2DL1+/2DS1+ en pacientes (n=18) y controles (n=8), KIR2DL1-/2DS1+ en pacientes (n=20) y controles (n=8), y KIR2DL1-/2DS1+/2DL2/L3/S2-/3DL1- en pacientes (n=20) y controles (n=8); Abreviaturas: ns, no significativo. El número de células se representa como la media del nº Abs de células/μl ± SEM. Los valores de *p* fueron determinados mediante un test de Kruskal-Wallis.

Adicionalmente, se realizó un análisis para estudiar las poblaciones de células TCD8+ y NKCD56^{dim} que expresan las moléculas CD158a/h (KIR2DL1/S1) o CD158b/j (KIR2DL2/3/S2), en sangre periférica de los pacientes con melanoma y en la población control, en función de su genotipo HLA-C. Para ello, tanto los pacientes como los controles fueron clasificados de acuerdo al dimorfismo en la posición 80 de la cadena α 1 de la molécula HLA-C. Se clasificó como grupo C1 a aquellos alelos portadores de "Asn" en la posición 80, incluyendo los alelos HLA-C*01, HLA-C*03, HLA-C*07, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14 y HLA-C*16 (excepto HLA-C*16:02), y como grupo C2, a los alelos HLA-C portadores de "Lys" en posición 80, entre los que se encuentran 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. De esta manera, los pacientes y controles se clasificaron en tres grupos: individuos homocigotos para los alelos del grupo C1 (C1C1), individuos homocigotos para los alelos del grupo C2 (C2C2) e individuos heterocigotos (C1C2) (ver tabla 37).

Al segregar las poblaciones de linfocitos TCD8+ y células NKCD56^{dim} en función de la expresión de CD158a/h y CD158b/j, y estudiar su distribución en función de los genotipos HLA-C en pacientes y controles (figura 46), se observó un aumento de la población de linfocitos T CD8+ y células NKCD56^{dim} CD158a/h+ en el grupo de pacientes respecto al grupo control (figura 46A y B), que alcanzó la significación estadística al comparar el grupo de pacientes con respecto a los controles con genotipo heterocigoto C1C2 ($p=0.023$) (figura 46B).

El estudio de los linfocitos T CD8+ y células NK CD56^{dim} que expresan CD158b/j, no mostró diferencias significativas al comparar el grupo de pacientes con el grupo de control en función de los 3 genotipos estudiados (figura 46C y D).

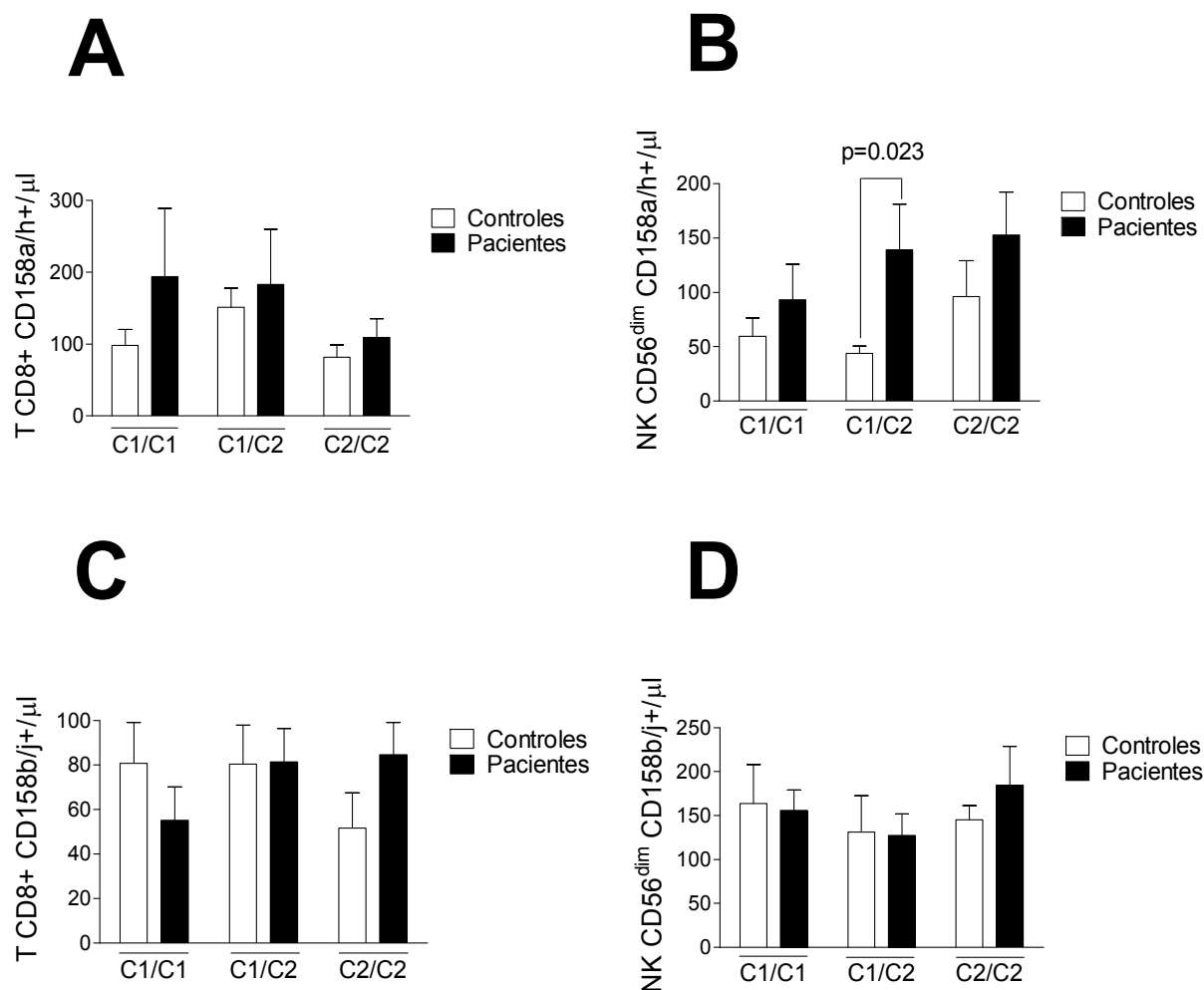


Figura 46. Poblaciones de linfocitos T CD8+ y células NK CD56^{dim} CD158a/h+ y NK CD56^{dim} CD158b/j+ en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles según su genotipo HLA-C. (A y B) Linfocitos TCD8+ y células NK CD56^{dim} CD158a/h+ en pacientes e individuos sanos según su genotipo HLA-C. (C y D) Linfocitos TCD8+ y células NK CD56^{dim} CD158b/j+ en pacientes e individuos sanos según su genotipo HLA-C. Pacientes: C1C1 (n=9), C1C2 (n=17), C2C2 (n=7). Controles: C1C1 (n=7), C1C2 (n=11), C2C2 (n=6). El n° de células se representa como la media ± SEM. Los valores de *p* fueron determinados mediante el test de Kruskal-Wallis.

6. INFLUENCIA DE LOS GENES KIR, LIGANDOS HLA-I Y LOS PARES KIR-LIGANDO EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MELANOMA

Posteriormente se valoró la influencia de los receptores KIR y sus ligandos HLA clase I sobre la supervivencia de los pacientes con melanoma a 10 años. En dicho estudio, no se demostró un impacto de los distintos genotipos de los ligandos HLA-C (C1C1, C1C2, C2C2) en la supervivencia de los pacientes con melanoma (figura 47A). Tampoco se demostró una asociación entre la presencia o ausencia del gen KIR2DL3 y de los genotipos KIR2DL3+C1+ y KIR2DL1+2DS1-C2C2 y la supervivencia de los pacientes con melanoma (figura 47B-D).

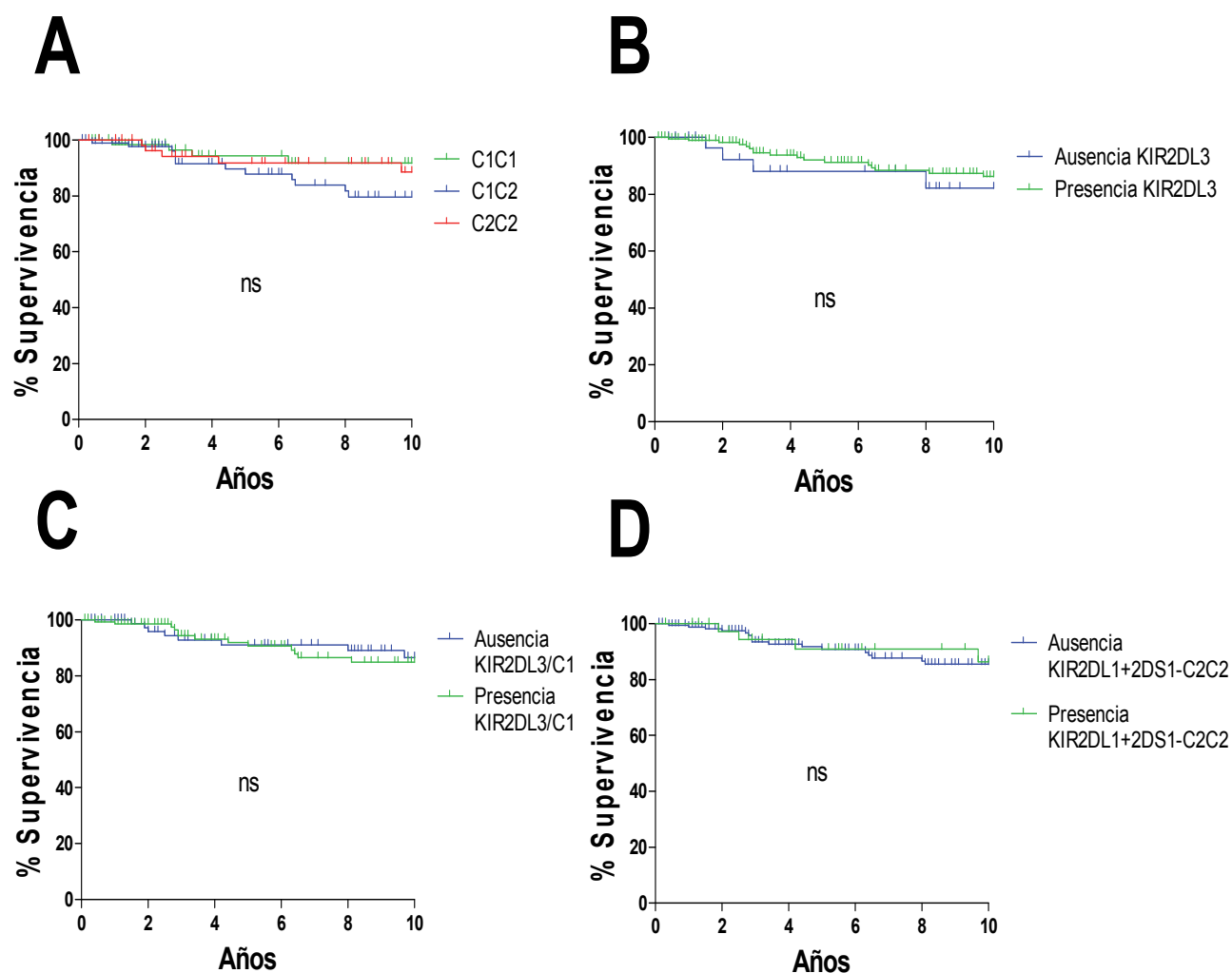


Figura 47. Impacto del dimorfismo de los ligandos HLA-C, del gen KIR2DL3 y de los genotipos KIR2DL3/C1 y KIR2DL1+2DS1-C2C2 en la supervivencia de los pacientes con melanoma. (A) Pacientes homocigotos C1 (C1C1) (n=49) (línea verde), heterocigotos (C1C2) (n=82) (línea azul) y homocigotos C2 (C2C2) (n=52) (línea roja). (B) Pacientes con presencia (n=198) (línea verde) o ausencia (n=32) (línea azul) del gen KIR2DL3. (C) Pacientes con presencia (n=145) (línea verde) o ausencia (n=85) (línea azul) del genotipo KIR2DL3/C1. (D) Pacientes con presencia (n=42) (línea verde) o ausencia (n=188) (línea azul) del genotipo KIR2DL1+2DS1-C2C2 (D). Los valores de p fueron determinados mediante un test de Log-rank.

7. POLIMORFISMO DE LA REGIÓN NKC EN PACIENTES CON MELANOMA

En cuanto al papel del polimorfismo de los SNPs de la región NKC localizados en el cromosoma 12 previamente descritos, el estudio del polimorfismo de los SNPs NKC3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 y 17 en pacientes con melanoma cutáneo reveló una frecuencia disminuida de individuos portadores de adenina (A) en el SNP NKC7 en el grupo de pacientes de melanoma y en el grupo de pacientes con MES respecto al grupo control (50% y 49% vs. 60%; $P=0.042$, $P_c=0.34$, $OR=0.66$ y $P=0.03$, $P_c=0.24$, $OR=0.6$, respectivamente) (tabla 38).

El análisis de los SNPs estudiados en función de las características clínicas al diagnóstico mostró una frecuencia aumentada de individuos portadores de guanina (G) en el SNP NKC9, de timina (T) en el SNP NKC11 y de citosina (C) en el SNP NKC12 en el grupo de pacientes de melanoma que presentaban ulceración con respecto al grupo de pacientes sin ulceración (98%, 68% y 73% vs. 86%, 51% y 56%; $P=0.033$, $P_c=0.26$, $OR=7$; $P=0.043$, $P_c=0.34$, $OR=2$; $P=0.041$, $P_c=0.33$, $OR=2.1$, respectivamente). Por el contrario, la frecuencia de individuos portadores de guanina (G) en el SNP NKC9 se encontraba disminuida en pacientes con presencia de metástasis en GC respecto al grupo control (77% vs. 92%; $P=0.042$, $P_c=0.34$, $OR=0.3$). Además, también se encontró una disminución en la frecuencia de individuos portadores de citosina (C) en el SNP NKC4 y de timina (T) en el SNP NKC10, en el grupo de pacientes que presentaba metástasis en GC respecto al grupo de pacientes sin metástasis en GC (86% y 86% vs. 98% y 98%; $P=0.049$, $P_c=0.39$, $OR=1.32$ y $P=0.049$, $P_c=0.39$, $OR=0.16$, respectivamente) (tabla 39). Sin embargo, todas las diferencias anteriores no alcanzaron la significación estadística al aplicar la corrección de Bonferroni.

Tabla 38. Frecuencia alélica de los SNPs NKC3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 y 17 de la región NKC en pacientes de melanoma y controles.

Alelos NKC	Controles N=200 (%)	Pacientes con melanoma		
		Total N=233 (%)	Subtipo histológico	
			MES N=162(%)	MN N=29 (%)
NKC3				
C	169 (85)	208 (89)	143 (88)	27 (93)
G	31 (15)	25 (11)	81 (50)	16 (55)
NKC4				
C	111 (55)	114 (49)	155 (96)	28 (97)
T	89 (45)	94 (40)	65 (40)	14 (48)
NKC7				
A	120 (60)	116 (50)^a	79 (49)^b	16 (55)
T	80 (40)	117 (50)	145 (90)	27 (93)
NKC9				
A	86 (43)	148 (64)	59 (36)	12 (41)
G	114 (57)	85 (36)	141 (87)	26 (90)
NKC10				
A	89 (45)	85 (37)	60 (37)	11 (38)
T	111 (55)	148 (63)	155 (96)	28 (97)
NKC11				
C	171 (86)	208 (89)	142 (88)	27 (93)
T	29 (14)	25 (11)	83 (51)	17 (59)
NKC12				
C	119 (60)	135 (58)	90 (56)	20 (69)
G	81 (40)	98 (42)	136 (84)	26 (90)
NKC17				
C	124 (62)	155 (67)	105 (65)	21 (73)
G	76 (38)	78 (33)	130 (80)	22 (76)

^a, pacientes de melanoma vs. controles (P=0.042, Pc=0.34, OR=0.66); ^b, MES vs. controles (P=0.03, Pc=0.24, OR=0.6). Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma Nodular; NKC, complejo de genes natural killer. El valor de *p* fue determinado mediante el test exacto de Fisher bilateral.

Tabla 39. Frecuencia alélica de los SNPs NKC3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 y 17 de la región NKC en pacientes de melanoma según las características clínicas al diagnóstico.

Alelos NKC	Controles N=200 n(%)	Características clínicas al diagnóstico					
		Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis GC	
		≤ 1 N=128 n (%)	>1 N=104 n (%)	No N=173 n (%)	Si N=44 n (%)	No N=119 n (%)	Si N=22 n (%)
NKC3							
C	169 (85)	113 (88)	94 (90)	154 (89)	39 (89)	108 (91)	17 (77)
G	117 (59)	65 (51)	53 (51)	89 (51)	24 (55)	61 (51)	11 (50)
NKC4							
C	183 (92)	121 (95)	101(97)	164 (95)	43 (98)	116 (98)	19 (86)^e
T	89 (45)	54 (42)	41 (39)	70 (41)	22 (50)	46 (39)	10 (46)
NKC7							
A	120 (60)	62 (48)	53 (51)	84 (49)	26 (59)	59 (50)	11 (50)
T	172 (86)	114 (89)	96 (92)	157 (91)	39 (89)	110 (92)	18 (82)
NKC9							
A	86 (43)	49 (38)	36 (35)	65 (38)	17 (39)	41 (35)	10 (46)
G	184 (92)	109 (85)	96 (92)	149 (86)	73 (98)^a	100 (84)	17 (77)^d
NKC10							
A	89 (45)	50 (39)	35 (34)	66 (38)	16 (36)	42 (35)	10 (46)
T	186 (93)	122 (95)	101 (97)	165 (95)	43 (98)	116 (98)	19 (86)^f
NKC11							
C	171 (86)	113 (88)	94 (90)	154 (89)	39 (89)	109 (92)	17 (77)
T	120 (60)	66 (52)	57 (55)	88 (51)	30 (68)^b	65 (55)	12 (55)
NKC12							
C	119 (60)	71 (56)	63 (61)	96 (56)	32 (73)^c	69 (58)	13 (59)
G	168 (84)	107 (84)	90 (87)	147 (85)	37 (84)	105 (88)	16 (73)
NKC17							
C	124 (62)	87 (68)	67 (65)	118 (68)	25 (57)	78 (66)	13 (59)
G	165 (83)	105 (82)	84 (81)	142 (82)	35 (80)	96 (81)	17 (77)

^{a, b, c}, ulceración vs. no ulceración (P=0.033, Pc=0.26, OR=7; P=0.043, Pc=0.34 OR=2; P=0.041, Pc=0.33, OR=2.1, respectivamente). ^d, metástasis en GC vs. controles (P=0.042, Pc=0.34, OR=0.3). ^{e, f}, metástasis en GC vs. no metástasis GC (P=0.049, Pc=0.39, OR=1.32, P=0.049, Pc=0.39, OR=0.16, respectivamente). Abreviaturas: GC, ganglio centinela; NKC, complejo de genes natural killer. El valor de la p fue determinado mediante el test exacto de Fisher bilateral.

El análisis del polimorfismo de los SNPs de la región NKC fue ampliado al estudio de los genotipos. Los resultados revelaron una frecuencia aumentada de individuos con genotipo TT para el SNP NKC7 en el grupo de pacientes de melanoma y en el grupo de pacientes con MES respecto al grupo control (51% vs. 40%; $P=0.042$, $P_c=1.01$, $OR=1.51$ y $P=0.03$, $P_c=0.72$, $OR=1.5$, respectivamente). Por el contrario, la una frecuencia de individuos con genotipo AG para el SNP NKC9 en el grupo de pacientes con melanoma y en el grupo de pacientes con MES estaba disminuida respecto al grupo control (25% y 23% vs. 35%; $P=0.026$, $P_c=0.62$, $OR=0.62$ y $P=0.021$, $P_c=0.50$, $OR=0.6$, respectivamente), como se muestra en la tabla 40.

Al realizar dicho estudio segregando a los pacientes de acuerdo a las características clínicas al diagnóstico, se encontró una disminución en el número de individuos homocigotos AA para el SNP NKC9, homocigotos CC para el SNP NKC11 y de aquellos homocigotos GG para el SNP NKC12 en el grupo de pacientes con ulceración respecto al grupo de pacientes sin ulceración (2%, 32% y 27% vs. 14%, 49% y 45%; $P=0.033$, $P_c=0.79$, $OR=0.1$; $P=0.043$, $P_c=1.03$, $OR=0.48$; $P=0.04$, $P_c=0.96$, $OR=0.46$, respectivamente). Por el contrario, la frecuencia de individuos con genotipo AA para el SNP NKC9 en el grupo de pacientes que presentaban metástasis se encontraba aumentada respecto al grupo control (23% vs. 8%; $P=0.042$, $P_c=1.01$, $OR=3.4$). Del mismo modo, la frecuencia de individuos con genotipo AA para el SNP NKC10 en el grupo de pacientes con metástasis también estaba aumentada respecto al grupo de pacientes que no presentaban metástasis (14% vs. 2%; $P=0.049$, $P_c=1.18$, $OR=6.1$) (tabla 41). Estas diferencias no alcanzaron la significación estadística cuando se aplicó la corrección de Bonferroni.

Tabla 40. Frecuencia genotípica de los SNPs NKC3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 y 17 de la región NKC en pacientes de melanoma y controles.

Genotipo NKC	Pacientes con melanoma			
	Controles N=200 (%)	Totales N=233 (%)	Subtipo histológico	
			MES N=162 (%)	MN N=29 (%)
NKC3				
CC	83 (42)	114 (49)	81 (50)	13 (45)
CG	86 (43)	94 (40)	62 (38)	14 (48)
GG	31 (15)	25 (11)	19 (12)	2 (7)
NKC4				
CC	111 (56)	138 (59)	97 (60)	15 (52)
CT	72 (36)	85 (37)	58 (36)	13 (45)
TT	17 (8)	10 (4)	7 (4)	1 (3)
NKC7				
AA	28 (14)	22 (9)	17 (11)	2 (7)
AT	92 (46)	94 (40)	62 (38)	14 (48)
TT	80 (40)	117 (51)^a	83 (51)^c	13 (45)
NKC9				
AA	16 (8)	27 (12)	21 (13)	3 (10)
AG	70 (35)	58 (25)^b	38 (23)^d	9 (31)
GG	114 (57)	148 (63)	103 (64)	17 (59)
NKC10				
AA	14 (7)	9 (4)	7 (4)	1 (3)
AT	75 (38)	76 (33)	53 (33)	10 (35)
TT	111 (55)	148 (63)	102 (63)	18 (62)
NKC11				
CC	80 (40)	109 (47)	79 (49)	12 (41)
CT	91 (46)	99 (42)	63 (39)	15 (52)
TT	29 (14)	25 (11)	20 (12)	2 (7)
NKC12				
CC	32 (16)	35 (15)	26 (16)	3 (10)
CG	87 (44)	100 (43)	64 (40)	17 (59)
GG	81 (40)	98 (42)	72 (44)	9 (31)
NKC17				
CC	35 (17)	43 (18)	32 (20)	7 (24)
CG	89 (45)	112 (48)	73 (45)	14 (48)
GG	76 (38)	78 (34)	57 (35)	8 (28)

^{a, b}, pacientes de melanoma vs. controles (P=0.042, Pc=1.01, OR=1.51; P=0.026, Pc=0.62, OR=0.62, respectivamente); ^{c, d}, MES vs. controles (P=0.03, Pc=0.72, OR=1.5; P=0.021, Pc=0.50, OR=0.6). Abreviaturas: MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular; NKC, complejo de genes natural killer. El valor de la *p* fue determinado mediante el test exacto de Fisher bilateral.

Tabla 41. Frecuencia genotípica de los SNPs NKC3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 y 17 de la región NKC en pacientes de melanoma según las características clínicas al diagnóstico.

Genotipo NKC	Controles N=200 (%)	Características clínicas al diagnóstico					
		Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤ 1 N=128 n (%)	>1 N=104 n(%)	No N=173 n (%)	Si N=44 n (%)	No N=119 n (%)	Si N=22 n (%)
NKC3							
CC	83 (42)	63 (49)	51 (49)	84 (49)	20 (46)	58 (49)	11 (50)
CG	86 (43)	50 (39)	43 (41)	70 (41)	19 (43)	50 (42)	6 (27)
GG	31 (16)	15 (12)	10 (10)	19 (11)	5 (11)	11 (9)	5 (23)
NKC4							
CC	111 (56)	74 (58)	63 (61)	103 (60)	22 (50)	73 (61)	12 (55)
CT	72 (36)	47 (37)	38 (37)	61 (35)	21 (48)	43 (36)	7 (32)
TT	17 (9)	7 (6)	3 (3)	9 (5)	1 (2)	3 (2)	3 (14)
NKC7							
AA	28 (14)	14 (11)	8 (8)	16 (9)	5 (11)	9 (8)	4 (18)
AT	92 (46)	48 (38)	45 (43)	68 (39)	21 (48)	50 (42)	7 (32)
TT	80 (40)	66 (52)	51 (49)	89 (51)	18 (41)	60 (50)	11 (50)
NKC9							
AA	16 (8)	19 (15)	8 (8)	24 (14)	1 (2)^a	19 (16)	5 (23)^d
AG	70 (35)	30 (23)	28 (27)	41 (24)	16 (36)	22 (19)	5 (23)
GG	114 (57)	79 (62)	68 (65)	108 (62)	27 (61)	78 (65)	12 (54)
NKC10							
AA	14 (7)	5 (5)	3 (3)	8 (5)	1 (2)	3 (2)	3 (14)^e
AT	75 (38)	44 (34)	32 (31)	58 (33)	15 (34)	39 (33)	7 (32)
TT	111 (56)	78 (61)	69 (66)	107 (62)	28 (64)	77 (65)	12 (55)
NKC11							
CC	80 (40)	62 (48)	47 (45)	85 (49)	14 (32)^b	54 (45)	10 (46)
CT	91 (46)	51 (40)	47 (45)	69 (40)	25 (57)	55 (46)	7 (32)
TT	29 (15)	15 (12)	10 (10)	19 (11)	5 (11)	10 (8)	5 (23)
NKC12							
CC	32 (16)	21 (16)	14 (13)	26 (15)	7 (16)	14 (12)	6 (27)
CG	87 (43)	50 (39)	49 (47)	70 (40)	25 (57)	55 (46)	7 (32)
GG	81 (41)	57 (45)	41 (39)	77 (45)	12 (27)^c	50 (42)	9 (41)
NKC17							
CC	35 (18)	23 (18)	20 (19)	31 (18)	9 (21)	23 (19)	5 (23)
CG	89 (45)	64 (50)	47 (45)	87 (50)	16 (36)	55 (46)	8 (36)
GG	76 (38)	41 (32)	37 (36)	55 (32)	19 (43)	41 (35)	9 (41)

^{a, b, c}, ulceración vs. no ulceración (P=0.033, Pc=0.79, OR=0.1; P=0.043, Pc=1.03, OR=0.48; P=0.04, Pc=0.96, OR=0.46, respectivamente). ^d, metástasis en GC vs. controles (P=0.042, Pc=1.01, OR=3.4). ^e, metástasis en GC vs. no metástasis en GC (P=0.049, Pc=1.18, OR=6.1). Abreviaturas: GC, ganglio centinela; NKC, complejo de genes natural killer. El valor de la p fue determinado mediante el test exacto de Fisher bilateral.

8. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO DE LOS SNP DE LA REGIÓN NKC Y ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE MELANOMA.

Posteriormente, se realizó un estudio de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs localizados en la región NKC. Como se puede observar en la figura 48, los resultados de dicho estudio revelaron una fuerte asociación entre los SNPs NKC3, NKC7, NKC11 y NKC-12, y entre los SNPs NKC4, NKC9 y NKC10, con un valor de $r^2 > 0.7$. Los SNPs NKC3, NKC7, NKC11 y NKC12 mostraron una asociación débil con los SNPs NKC4, NKC9 y NKC10, con un valor de $r^2 \leq 0.7$. Por otro lado, se observó que el SNP NKC-17, localizado en la región promotora del gen NKG2A, se encontraba muy débilmente asociado al resto de SNPs. Estos resultados sugieren la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los SNPs NKC3, NKC7, NKC11 y NKC12, y entre los SNPs NKC4, NKC9 y NKC10. Además, muestran una ausencia de desequilibrio de ligamiento entre el SNP NKC17 y el resto de los SNPs estudiados. Por tanto, los resultados aquí expuestos sugieren la existencia de dos grupos de SNPs claramente diferenciados, que permiten definir 2 bloques de haplotipos. El primer grupo, al que denominamos bloque 1 (hb-1) que incluye a los SNPs NKC3, NKC7, NKC11 y NKC12, y el segundo grupo, al que denominamos bloque 2 (hb-2) compuesto por los SNPs NKC4, NKC9 y NKC10 (figura 48).

NKC SNPs	3	4	7	9	10	11	12
3							
4	0.48						
7	0.83	0.49					
9	0.50	0.92	0.54				
10	0.42	0.79	0.47	0.86			
11	0.82	0.49	0.86	0.54	0.45		
12	0.78	0.46	0.76	0.49	0.42	0.83	
17	0.35	0.21	0.35	0.21	0.17	0.37	0.29

Bloque 1 (hb-1) NKC-3-7-11-12

Bloque 2 (hb-2) NKC-4-9-10

Figura 48. Desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de la región NKC. Se representan los valores de r^2 para la asociación de cada uno de los SNPs con el resto de SNPs. Coloreados en rojo se muestran las casillas de las combinaciones de SNPs con valores de $r^2 > 0.7$ (alto grado de desequilibrio de ligamiento), en amarillo las combinaciones de SNPs con $0.5 \leq r^2 \leq 0.7$, y en azul las combinaciones con $r^2 < 0.5$. En el pie de la figura se representan los dos bloques de SNPs con alto grado de desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0.7$), el bloque 1, constituido por los SNPs NKC3, 7, 11 y 12, y el bloque 2 constituido por los SNPs NKC4, 9 y 10. Los bloques de haplotipos fueron definidos según el método de Gabriel (Haploview 4.0). Abreviaturas: NKC, complejo de genes natural killer; hb, bloque haplotípico; SNP, polimorfismo de nucleótido simple.

El estudio del bloque1 (hb-1) en la población control permitió detectar una serie de 14 haplotipos diferentes (tabla 42), siendo los dos haplotipos más frecuentes el haplotipo NK-1, formado por una C en el SNP NKC3, una A en el SNP NKC7, una C en el SNP NKC11 y una G en el SNP NKC12, y el haplotipo NK-2, constituido por una G en el SNP NKC3, una A en el SNP NKC7, una T en el SNP NKC11 y una C en el SNP NKC12, con una frecuencia de 0.587 y 0.329 en el grupo control, respectivamente (tabla 43).

El resultado del análisis de los diferentes haplotipos del bloque 1 (hb-1) reveló una frecuencia similar de los haplotipos mayoritarios NK-1 y NK-2 entre el grupo de pacientes y el grupo control. Sin embargo, la frecuencia del haplotipo NK-3, formado por una C en el SNP NKC3, una T en el SNP NKC7, una C en el SNP NKC11 y una C en el SNP NKC12, estaba aumentada en el grupo de pacientes con melanoma respecto al grupo control (4.8% vs. 1.5%; $P=0.007$, $P_c=0.098$). Por el contrario, la frecuencia del haplotipo NK-10, formado por una G en el SNP NKC3, una A en el SNP NKC7, una C en el SNP NKC11 y una G en el SNP NKC12, estaba disminuida en el grupo de pacientes con melanoma respecto al grupo control (0% vs. 1%; $P=0.03$, $P_c=0.42$), sin embargo, dichas diferencias no alcanzaron la significación estadística cuando se aplicó la corrección de Bonferroni (tabla 43).

En un análisis posterior, se evaluó el riesgo de desarrollar melanoma en individuos portadores de los diferentes genotipos constituidos por los dos haplotipos más frecuentes del bloque hb-1 en la población estudiada (NK-1 y NK-2). Dicho estudio no reveló diferencias significativas respecto al riesgo de desarrollar melanoma entre los individuos portadores de los genotipos homocigotos (NK-1/NK-1, NK-2/NK-2) o heterocigoto (NK-1/NK-2) (tabla 44).

Tabla 42. Haplotipos del bloque-1 de SNPs de la región NKC (hb-1).

Haplotipo NKG2D hb-1	NKC			
	3	7	11	12
NK-1	C	T	C	G
NK-2	G	A	T	C
NK-3	C	T	C	C
NK-4	G	T	T	C
NK-5	C	A	T	C
NK-6	G	A	T	G
NK-7	C	T	T	C
NK-8	G	T	C	G
NK-9	G	T	C	C
NK-10	G	A	C	G
NK-11	C	A	T	G
NK-12	C	A	C	G
NK-13	C	T	T	G
NK-14	C	A	C	C

Tabla 43. Frecuencia de los haplotipos del bloque-1 de SNPs de la region NKC (hb-1).

Haplotipo NKG2D hb-1	Frecuencia Alélica		P/Pc	χ^2
	Controles	Pacientes		
NK-1	0.587	0.619	0.33	(0.94)
NK-2	0.329	0.276	0.09	(2.87)
NK-3	0.015	0.048	0.007/0.098	(7.26)
NK-4	0.010	0.011	0.93	(0.008)
NK-5	0.010	0.011	0.92	(0.009)
NK-6	0.010	0.009	0.82	(0.052)
NK-7	0.005	0.013	0.23	(1.45)
NK-8	0.005	0.007	0.74	(0.11)
NK-9	0.005	0.006	0.84	(0.04)
NK-10	0.010	0.000	0.03/0.42	(4.56)
NK-11	0.005	0.000	0.14	(2.19)
NK-12	0.003	0.000	0.27	(1.19)
NK-13	0.003	0.000	0.31	(1.04)
NK-14	0.003	0.000	0.27	(1.21)

*controles sanos y pacientes con melanoma (n=400 y n=466 cromosomas, respectivamente). Los valores de p y χ^2 fueron determinados mediante test Chi-cuadrado. Abreviaturas: hb-1, bloque haplotípico 1.

Tabla 44. Riesgo de incidencia de melanoma para los genotipos NKG2D del bloque hb-1.

Genotipos NKG2D hb-1	Controles n=200 n(%)	Pacientes con melanoma n=233 n(%)	OR (IC95%)	Valor de p
NK-1/NK-1	73 (37)	92 (40)	1.135 (0.769-1.676)	0.55
NK-1/NK-2	80 (40)	84 (36)	0.846 (0.573-1.248)	0.23
NK-2/NK-2	24 (12)	20 (9)	0.689 (0.368-1.288)	0.27

*hb-1, Bloque haplotípico 1; OR, Odds ratio.

El estudio del bloque 2 (hb-2) en la población control permitió detectar una serie de 7 haplotipos diferentes (tabla 45), siendo los dos haplotipos más frecuentes el haplotipo NK-1, constituido por una G en el SNP NKC4, una G en el SNP NKC9 y una T en el SNP NKC10, y el haplotipo NK-2, constituido por una G en el SNP NKC4, una G en el SNP NKC9 y una T en el SNP NKC10, con una frecuencia de 0.717 y 0.240 en el grupo control, respectivamente (tabla 46).

El resultado del análisis de los diferentes haplotipos del bloque 2 (hb-2) reveló una frecuencia similar de los dos haplotipos mayoritarios (NK-1 y NK-2). Sin embargo, la frecuencia del haplotipo NK-3, constituido por una G en el SNP NKC4, una A en el SNP NKC9 y una T en el SNP NKC10, estaba significativamente aumentada en el grupo de pacientes con melanoma respecto al grupo control (3.9% vs. 0%; $P=0.00009$, $P_c=0.0006$) (tabla 46).

Posteriormente, se evaluó el riesgo de desarrollar melanoma en individuos portadores de los diferentes genotipos constituidos por los dos haplotipos más frecuentes del bloque hb-2 en la población estudiada (NK-1 y NK-2). Dicho estudio no reveló diferencias significativas respecto al riesgo de desarrollar melanoma en los individuos portadores de los diferentes genotipos homocigotos (NK-1/NK-1, NK-2/NK-2) o heterocigoto (NK-1/NK-2) (tabla 47).

Tabla 45. Haplotipos del bloque-2 de SNPs de la región NKC (hb-2).

Haplotipos NKG2D hb-2	NKC		
	4	9	10
NK-1	G	G	T
NK-2	A	A	A
NK-3	G	A	T
NK-4	A	G	T
NK-5	G	G	A
NK-6	A	A	T
NK-7	G	A	A

Tabla 46. Frecuencia de los haplotipos del bloque-2 de SNPs de la región NKC (hb-2).

Haplotipos NKG2D hb-2	Frecuencia Alélica		P/Pc	χ^2
	Controles	Pacientes		
NK-1	0.717	0.732	0.63	(0.23)
NK-2	0.240	0.197	0.13	(2.30)
NK-3	0.000	0.039	0.00009/0.0006	(15.25)
NK-4	0.013	0.024	0.24	(1.35)
NK-5	0.015	0.004	0.10	(2.69)
NK-6	0.012	0.004	0.19	(1.67)
NK-7	0.003	0.000	0.31	(1.04)

*controles sanos y pacientes con melanoma (n=400 y n=466 cromosomas, respectivamente). Los valores de p y χ^2 fueron determinados mediante test Chi-cuadrado. Abreviaturas: hb, bloque haplotípico.

Tabla 47. Riesgo de incidencia de melanoma para los genotipos NKG2D del bloque hb-2.

Genotipos NKG2D hb-2	Controles n=200 n(%)	Pacientes con melanoma n=233 n(%)	OR (IC95%)	Valor de p
NK-1/NK-2	65 (33)	56 (24)	0.657 (0.431-1.002)	0.054
NK-2/NK-2	13 (7)	8 (3)	0.511 (0.208-1.260)	0.18

*hb-2, Bloque haplotípico 2; OR, Odds ratio.

9. LINFOCITOS T CD8+ y CÉLULAS NK QUE EXPRESAN NKG2D EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA

El estudio de las poblaciones de linfocitos TCD8+ y células NK que expresan NKG2D se realizó en 48 pacientes con melanoma y 37 controles sanos compatibles en edad y sexo. 33 de los pacientes fueron clasificados dentro del estadio I-II, 6 dentro del estadio III y en 9 de ellos no se dispuso de información sobre el estadio clínico al diagnóstico. Las características clínicas y demográficas de la serie de pacientes estudiada se describen en la tabla 48.

Tabla 48. Datos demográficos y características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de poblaciones celulares que expresan NKG2D.

Pacientes (n=48)	Edad/ Sexo	Estadio Clínico (*)	Pacientes (n=48)	Edad/ Sexo	Estadio Clínico (*)
1	42/M	I-II	25	53/H	I-II
2	24/M	I-II	26	61/H	-
3	66/H	I-II	27	70/H	I-II
4	68/H	I-II	28	60/H	I-II
5	62/M	I-II	29	35/H	I-II
6	56/M	I-II	30	69/H	I-II
7	26/M	-	31	56/H	I-II
8	68/M	I-II	32	70/M	-
9	49/M	I-II	33	61/H	I-II
10	41/H	I-II	34	55/H	I-II
11	45/H	I-II	35	66/H	I-II
12	58/M	I-II	36	46/H	I-II
13	78/M	-	37	55/M	I-II
14	54/M	I-II	38	31/M	I-II
15	61/M	I-II	39	47/H	III
16	50/M	III	40	34/H	III
17	64/M	-	41	60/M	I-II
18	52/M	I-II	42	60/H	I-II
19	39/H	-	43	57/M	-
20	43/H	I-II	44	50/M	III
21	68/M	I-II	45	30/H	III
22	51/M	-	46	51/H	I-II
23	35/M	-	47	38/M	I-II
24	67/H	III	48	24/H	I-II

*Estadios clínicos según la AJCC.

Los resultados del análisis de poblaciones celulares que expresan el receptor NKG2D en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles mostraron un aumento en el número de linfocitos TCD8+ NKG2D+ en pacientes con melanoma respecto al grupo control, sin embargo dicho aumento no alcanzó la significación estadística (figura 49A). Los valores absolutos de células NKCD56^{dim} NKG2D+ y NKCD56^{bright} NKG2D+ fueron similares en el grupo de pacientes con melanoma y el grupo control (figura 49A).

Al segregar los pacientes de melanoma en los distintos estadios clínicos, se observó un aumento del número de linfocitos TCD8+ NKG2D+ en el grupo de pacientes con melanoma en estadio I-II respecto al grupo control y al grupo de pacientes en estadio III, aunque dicho aumento no alcanzó la significación estadística (figura 49B). Los valores absolutos de células NKCD56^{dim} y NKCD56^{bright} fueron similares en los grupos de pacientes con melanoma en estadio I-II, estadio III y en el grupo control (figura 49B).

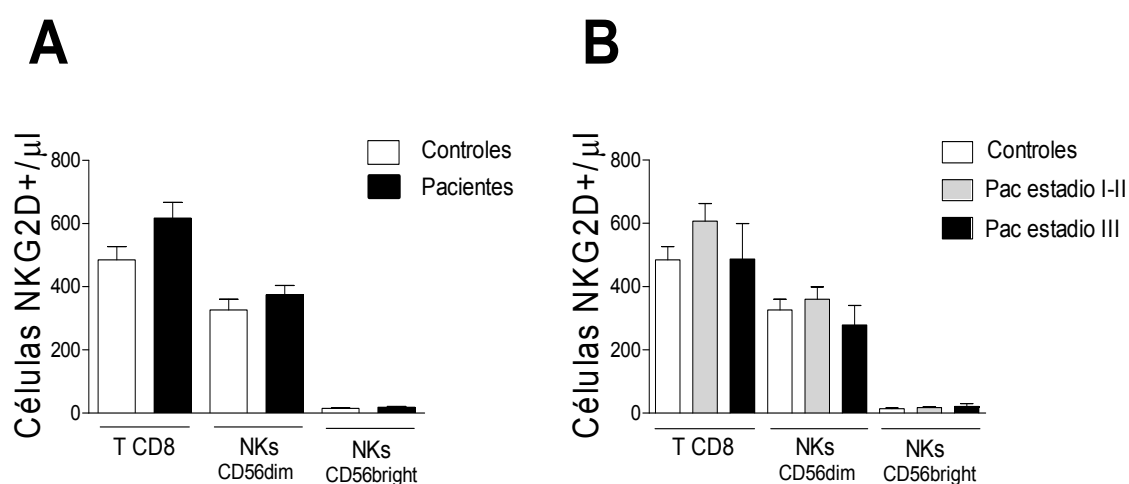


Figura 49. Poblaciones de células que expresan NKG2D en sangre periférica de pacientes con melanoma y controles. (A) Células NKG2D+/μl en pacientes y controles. Pacientes (n=48); Controles (n=37). (B) Células NKG2D+/μl en pacientes en estadio I-II, estadio III y controles. Pacientes en estadio I-II (n=33), pacientes en estadio III (n=6), controles (n=37). El número de células se representa como la media ± SEM. Los valores de *p* fueron determinados mediante el test ANOVA de una vía y kruskal-wallis.

En un análisis posterior, se estudió la intensidad media de fluorescencia (IMF) de NKG2D en células de sangre periférica de pacientes con melanoma y controles. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de NKG2D en los linfocitos TCD8+, células NKCD56^{dim} y células NKCD56^{bright} en pacientes de melanoma respecto al grupo control (P=0.0003, P=0.0014 y P=0.0138, respectivamente) (figura 50).

El estudio de la intensidad media de fluorescencia del receptor NKG2D sobre los linfocitos TCD8+ y las células NK también se realizó agrupando a los pacientes en estadio I-II y aquellos en estadio III. Los resultados revelaron un aumento significativo de la expresión de NKG2D en los linfocitos TCD8+ de los pacientes en estadio I-II y en estadio III respecto al grupo control (P=0.01 y P=0.006, respectivamente) (figura 50A). Del mismo modo, se encontró una expresión aumentada de NKG2D en las células NKCD56^{dim} de los pacientes en estadio I-II y en estadio III respecto al grupo control (P=0.0187 y P=0.0048, respectivamente) (figura 50B). También se observó una expresión aumentada de NKG2D en las células NKCD56^{bright} de los pacientes en estadio I-II y en estadio III en comparación con el grupo control (P=0.0289 y P=0.0003, respectivamente), así como una expresión aumentada de NKG2D en las células NKCD56^{bright} de los pacientes en estadio III respecto a los pacientes en estadio I-II (P=0.0151) (figura 50C).

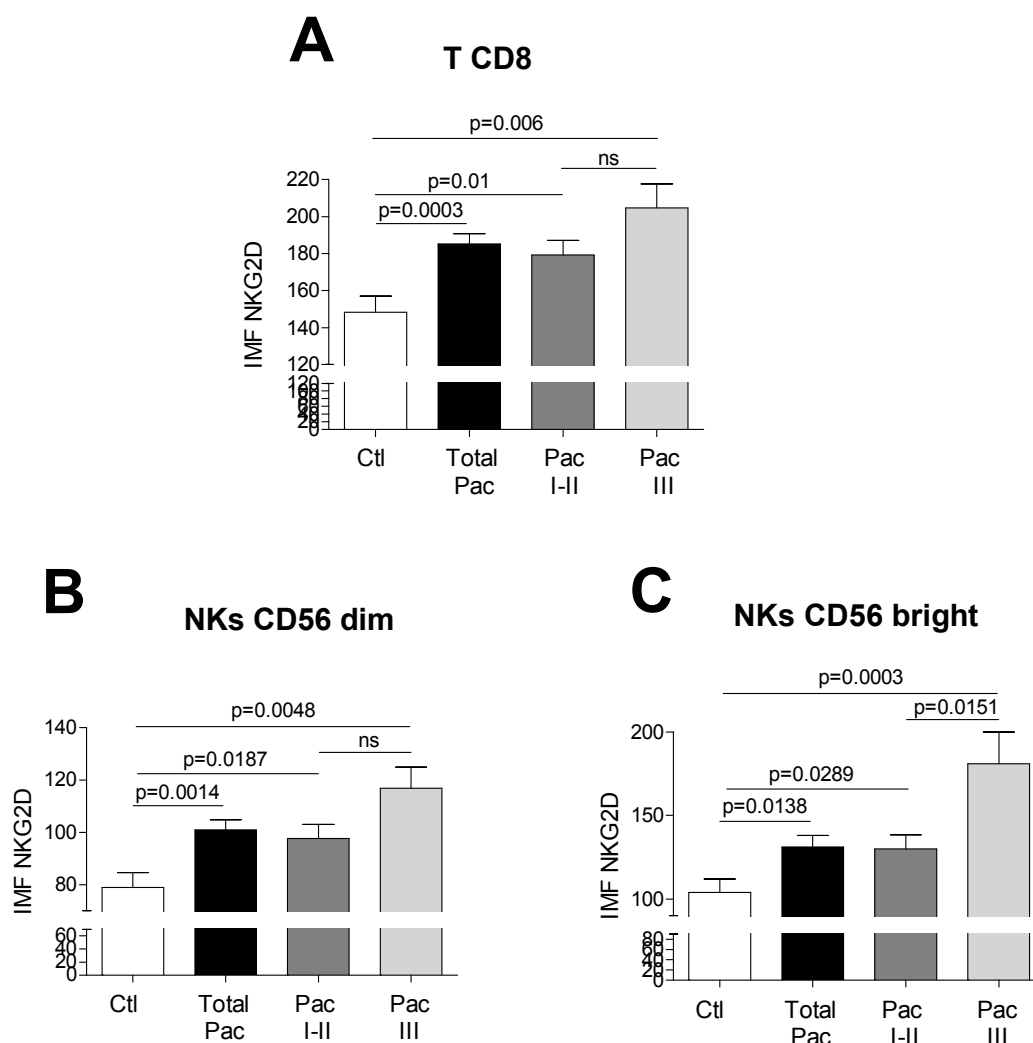


Figura 50. Intensidad media de fluorescencia (IMF) del receptor NKG2D en poblaciones linfocitarias de sangre periférica de pacientes con melanoma y controles. (A) IMF de NKG2D en linfocitos TCD8⁺ de pacientes con melanoma (totales, en estadio I-II, en estadio III) e individuos sanos. (B) IMF de NKG2D en células NKCD56^{dim} de pacientes con melanoma (totales, en estadio I-II, en estadio III) e individuos sanos. (C) IMF de NKG2D en células NK CD56^{bright} de pacientes con melanoma (totales, en estadio I-II, en estadio III) e individuos sanos. Controles (n=37), pacientes (n=48), pacientes en estadio I-II (n=33), pacientes en estadio III (n=6). El nº de células se representa como la media ± SEM. Los valores de *p* fueron determinados mediante un test t-student desapareado de 2 colas. Abreviaturas: Pac=grupo total de pacientes, Pac I-II=pacientes en estadio I-II, Pac III=pacientes en estadio III, IMF=Intensidad media de fluorescencia.

10. POLIMORFISMO DEL GEN MICA EN PACIENTES CON MELANOMA

Con la finalidad de estudiar el papel del polimorfismo del locus MICA en el melanoma cutáneo, se analizó la frecuencia de los distintos alelos del gen MICA en el grupo de pacientes con melanoma y el grupo control. En dicho análisis, se encontró una frecuencia significativamente aumentada del alelo MICA*009 en pacientes con melanoma respecto al grupo control (27% vs. 14%; $P=0.005$, $P_c=0.03$, $OR=2.14$, $IC95\%=1.31-3.49$) (tabla 49). Por el contrario, la frecuencia de los alelos MICA*002, MICA*010 y MICA*019 estaba disminuída en pacientes con melanoma respecto al grupo control (17%, 2% y 1% vs. 28%, 6% y 4%; $P=0.004$, $P_c=0.07$, $OR=0.5$, $IC95\%=0.32-0.80$; $P=0.022$, $P_c=0.37$, $OR=0.27$, $IC95\%=0.09-0.86$; $P=0.014$, $P_c=0.24$, $OR=0.10$, $IC95\%=0.01-0.83$, respectivamente); sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística al aplicar la corrección de Bonferroni (tabla 49).

Además, también se realizó un estudio para comparar la frecuencia de los distintos alelos del gen MICA entre los grupos de pacientes con melanoma segregados en función de las características clínicas al diagnóstico (grosor tumoral, ulceración y metástasis en ganglio centinela), y el grupo de control, aunque el resultado no reveló diferencias significativas (datos no mostrados).

Tabla 49. Frecuencia de los distintos alelos del gen MICA en pacientes con melanoma y controles.

Alelos	Controles	Pacientes con melanoma	PIP _c
	N=200 n (%)	N=233 n (%)	
<i>MICA*001</i>	24 (12)	38 (16)	
<i>MICA*002</i>	57 (28)	39 (17)^a	0.004/0.07
<i>MICA*004</i>	52 (26)	77 (33)	
<i>MICA*005</i>	1 (0.5)	0 (0)	
<i>MICA*006</i>	1 (0.5)	0 (0)	
<i>MICA*007</i>	12 (6)	14 (6)	
<i>MICA*008</i>	105 (52)	117 (50)	
<i>MICA*009</i>	29 (14)	62 (27)^b	0.002/0.03
<i>MICA*010</i>	12 (6)	4 (2)^c	0.022/0.37
<i>MICA*011</i>	17 (8)	23 (10)	
<i>MICA*012</i>	5 (2)	7 (3)	
<i>MICA*015</i>	7 (3)	2 (1)	
<i>MICA*016</i>	14 (7)	26 (11)	
<i>MICA*017</i>	6 (3)	11 (5)	
<i>MICA*018</i>	11 (5)	17 (7)	
<i>MICA*019</i>	8 (4)	1 (1)^d	0.014/0.24
<i>MICA*027</i>	2 (1)	0 (0)	

^a, pacientes vs. controles (17% vs. 28%, P=0.004, P_c=0.07); ^b, pacientes vs. controles (27% vs. 14%, P=0.002, P_c=0.03); ^c, pacientes vs. controles (2% vs. 6%, P=0.02, P_c=0.37); ^d, pacientes vs. controles (1% vs. 4%, P=0.014, P_c=0.24). Abreviaturas: MICA, major histocompatibility complex class I chain-related gene A. El valor de *p* fue determinado mediante el test exacto de Fisher bilateral.

En base al desequilibrio de ligamiento previamente descrito en varias poblaciones humanas entre los alelos MICA*009 y HLA-B*51 (Petersdorf et al 1999, Gao et al 2006, Lucas et al 2008), se realizó un análisis para estudiar la posible asociación entre la combinación MICA*009/HLA-B*51 y el desarrollo de melanoma cutáneo. En primer lugar, se confirmó la existencia de una fuerte asociación entre MICA*009 y HLA-B*51 tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control (tabla 50). Además, esta asociación fué más fuerte en el grupo de pacientes que en el grupo control, ya que 31 de los 62 pacientes (50%) que presentaban el alelo MICA*009 coexpresaban HLA-B*51, mientras que en el grupo control 12 de los 29 controles (41%) que presentaban el alelo MICA*009 coexpresaban HLA-B*51. De hecho, la frecuencia de individuos que coexpresaban MICA*009 y HLA-B*51 fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que en el grupo control (13% vs. 6%, respectivamente, $P=0.015$). Sin embargo, tras realizar un análisis de regresión logística multivariante, los resultados mostraron que la combinación MICA*009/HLA-B*51 no parecía estar asociada con un mayor riesgo de desarrollar melanoma, mientras que MICA*009 sí parecía estar asociado a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, sin embargo no alcanzó la significación estadística probablemente debido al número de individuos estudiados (tabla 51).

Tabla 50. Asociación entre MICA*009 y HLA-B*51 en pacientes con melanoma y controles.

MICA*009	HLA-B*51	Controles N=200 n (%)	Pacientes melanoma N=233 n (%)	Valor <i>p</i>
+	+	12 (6)	31 (13)	0.015
+	-	17 (8.5)	31 (13)	
-	+	5 (2.5)	6 (3)	
-	-	166 (83)	165 (71)	
Valor <i>p</i>		< 0.0001	<0.0001	

Abreviaturas: MICA, major histocompatibility complex class I chain-related gene A. HLA, Human leukocyte antigens. El valor de *p* fue determinado por el test exacto de Fisher.

Tabla 51. Análisis de regresión logística multivariante del efecto de MICA*009 y la combinación MICA*009/HLA-B*51 en la susceptibilidad al melanoma.

Grupo de pacientes	Genotipo	OR	IC95%	Valor P
Total de pacientes	Edad	1.01	0.99-1.02	0.29
	Sexo	0.94	0.64-1.38	0.75
	MICA*009	1.76	0.93-3.31	0.08
	MICA*009/HLA-B*51	1.42	0.58-3.47	0.44

Abreviaturas: MICA, major histocompatibility complex class I chain-related gene A; HLA, antígenos leucocitarios humanos; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza. Nota: Las comparaciones se realizaron entre el grupo total de pacientes y el grupo control como grupo de referencia.

Posteriormente, se valoró la influencia del dimorfismo en posición 129 de los alelos MICA en la susceptibilidad y el pronóstico del melanoma. En la tabla 52 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del dimorfismo MICA-129 en pacientes con melanoma y en el grupo control. Como puede observarse, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los alelos portadores de Val o Met en la posición 129 del gen MICA entre el grupo de pacientes y el grupo control. Así mismo, tampoco se observaron diferencias significativas cuando se analizó la frecuencia de los genotipos homocigoto Val¹²⁹/Val¹²⁹, homocigoto Met¹²⁹/Met¹²⁹ y heterocigoto Met¹²⁹/Val¹²⁹, entre el grupo de pacientes y el grupo control (tabla 52).

En un análisis subsiguiente se examinó el dimorfismo en posición 129 del gen MICA atendiendo a las características clínicas al diagnóstico. Los resultados de dicho análisis no revelaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 53).

Tabla 52. Frecuencias alélicas y genóticas del dimorfismo MICA-129 en pacientes con melanoma y controles.

Polimorfismo MICA-129	Pacientes con melanoma		Valor de <i>p</i>
	Controles N=200 N(%)	N=233 N(%)	
Alelos			
Val ¹²⁹	177 (88)	209 (90)	0.76
Met ¹²⁹	122 (61)	131 (56)	0.33
Genotipos			
Val/Val ¹²⁹	78 (39)	102 (44)	0.33
Met/Val ¹²⁹	99 (49)	107 (46)	0.50
Met/Met ¹²⁹	23 (12)	24 (10)	0.76

Abreviaturas: MICA, Major Histocompatibility Complex class I chain-related gene A; Met, Metionina; Val, Valina. El valor de la *p* para la susceptibilidad a la enfermedad fue determinado mediante un test de Fisher bilateral.

Tabla 53. Frecuencias alélicas y genóticas del dimorfismo MICA-129 en pacientes con melanoma y controles según las características clínicas al diagnóstico.

Polimorfismo MICA-129	Controles N=200 n (%)	Pacientes con melanoma					
		Características clínicas al diagnóstico					
		Grosor (mm)		Ulceración		Metástasis en GC	
		≤ 1 N=128 n (%)	≥ 1 N=104 n (%)	No N=173 n (%)	Si N=44 n (%)	No N=119 n (%)	Si N=22 n (%)
Alelos							
Val ¹²⁹	177 (88)	115 (90)	93 (89)	157 (91)	37 (84)	108 (91)	20 (91)
Met ¹²⁹	122 (61)	70 (55)	60 (58)	101 (58)	24 (54)	70 (59)	12 (54)
Genotipos							
Val/Val ¹²⁹	78 (39)	58 (45)	44 (42)	72 (42)	20 (45)	49 (41)	10 (46)
Met/Val ¹²⁹	99 (49)	57 (44)	49 (47)	85 (49)	17 (39)	59 (50)	10 (45)
Met/Met ¹²⁹	23 (12)	13 (10)	11 (11)	16 (9)	7 (16)	11 (9)	2 (9)

Abreviaturas: MICA, major histocompatibility complex class I chain-related gene A; GC, Ganglio centinela; Met, Metionina; Val, Valina. Las comparaciones entre los grupos de pacientes y el grupo control se realizaron mediante un test Chi-cuadrado.

11. MICA SOLUBLE EN PACIENTES CON MELANOMA

En un análisis posterior, se realizó la determinación de la concentración de MICA soluble en muestras de plasma obtenidas en el momento del diagnóstico, de 30 pacientes con melanoma cutáneo y 26 controles sanos. De los 30 pacientes, 14 tenían un genotipo MICA-129 homocigoto V/V, 3 un genotipo homocigoto M/M, 10 un genotipo heterocigoto M/V, y en 3 de ellos no se dispuso de información acerca del genotipo. En lo que respecta al estadio clínico, 21 de los pacientes se clasificaron dentro de los estadios I-II, 5 dentro del estadio III, y en 4 de ellos no se dispuso de información acerca del estadio clínico (tabla 54).

Tabla 54. Datos demográficos, características clínicas y genotipo MICA de los pacientes incluidos en el estudio de MICA soluble.

Pacientes (n=30)	Edad/Sexo	Genotipo MICA	Estadio clínico*
1	66/H	V/V	I-II
2	61/M	M/V	I-II
3	52/M	M/V	I-II
4	51/M	V/V	I-II
5	68/M	M/V	I-II
6	51/M	M/V	I-II
7	70/H	M/V	I-II
8	69/H	V/V	I-II
9	56/H	V/V	I-II
10	61/H	V/V	I-II
11	56/H	V/V	I-II
12	46/H	M/V	I-II
13	55/M	V/V	I-II
14	31/M	M/V	I-II
15	47/H	V/V	III
16	34/H	V/V	III
17	60/H	M/M	I-II
18	57/M	V/V	I-II
19	30/H	M/V	III
20	53/H	M/M	III
21	24/H	M/M	I-II
22	45/H	V/V	I-II
23	60/H	V/V	III
24	63/M	-	-
25	69/H	V/V	I-II
26	62/H	M/V	I-II
27	61/M	V/V	I-II
28	68/M	M/V	-
29	57/M	-	-
30	60/H	-	-

M, Metionina; V, Valina; MICA, secuencia polipeptídica A relacionada con el MHC de clase I; * Estadios clínicos según AJCC.

Como se muestra en la figura 51, la concentración media de MICA soluble era similar entre el grupo de pacientes en estadios tempranos (I-II) y el grupo control, sin embargo, se encontraba disminuída en el grupo de pacientes en estadio III, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.

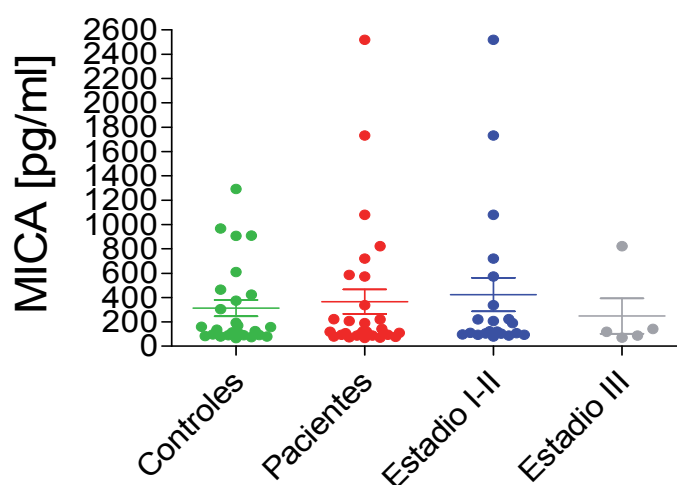


Figura 51. Concentración de MICA soluble en pacientes de melanoma y controles sanos. La concentración de MICA soluble en pg/ml se representa como la media \pm SEM. Controles en verde (n=26); Pacientes en rojo (n=30); Estadio I-II en azul (n=21); Estadio III en gris (n=5). Las comparaciones entre los grupos de pacientes y el grupo control fueron realizadas empleando el test t-Student y el test de Mann-Whitney.

En base a un estudio previo realizado “*in vitro*” con líneas celulares humanas de melanoma, donde se describe que las moléculas MICA-129Met son liberadas de la membrana celular en mayor medida que las moléculas MICA-129Val (Isernhagen A et al 2015), se analizó el nivel de MICA soluble en pacientes de melanoma en función del dimorfismo MICA-129.

Como se observa en la figura 52, la concentración media de MICA soluble se encontraba significativamente aumentada en aquellos individuos portadores de MICA-129^{Met}, incluyendo aquellos pacientes homocigotos para metionina (MICA-129^{Met/Met}) o heterocigotos (MICA129^{Met/Val}), en comparación con aquellos pacientes que no presentaban MICA-129^{Met} y que, por tanto, eran homocigotos para valina (MICA129^{Val/Val}).

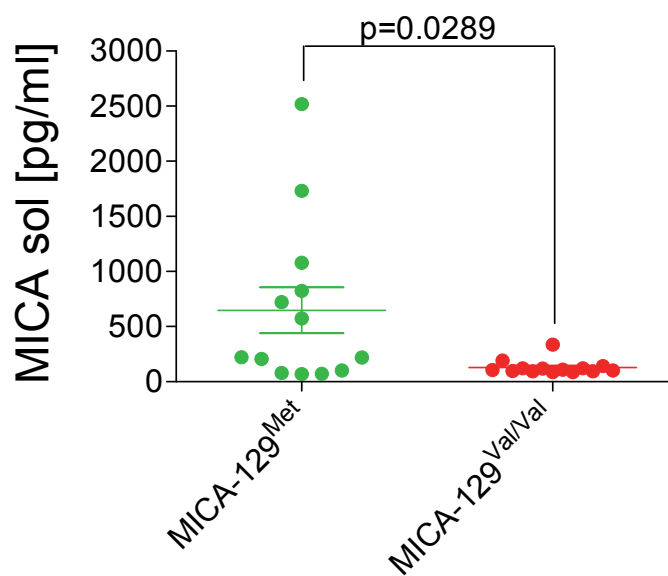


Figura 52. Concentración de MICA soluble en pacientes de melanoma según el dimorfismo MICA-129. Se representa la concentración de MICA soluble (pg/ml) como la media \pm SEM. MICA-129^{Met} (n=13); MICA-129^{Val/Val} (n=14). Las comparaciones entre los grupos de pacientes fueron realizadas empleando el test de Mann-whitney.

12. INFLUENCIA DEL DIMORFISMO MICA-129 EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MELANOMA

Los resultados con respecto al efecto del dimorfismo MICA-129 en la supervivencia a 10 años de los pacientes con melanoma, mostraron una supervivencia significativamente menor en pacientes con presencia de un alelo de la variante MICA-129^{Met} que en el grupo de pacientes que no presentaban alelos MICA-129^{Met} (homocigotos MICA-129^{Val/Val}) (87% vs. 95%, P=0.008) (figura 53A). Esta disminución en la supervivencia se observó tanto en los pacientes con genotipo MICA-129^{Met/Met} como en aquellos con genotipo MICA-129^{Met/Val} respecto a los pacientes con genotipo MICA-129^{Val/Val}, sin embargo, únicamente alcanzó la significación estadística en el caso de los pacientes con genotipo MICA-129^{Met/Val} (P=0.008) y no en el caso de los pacientes con genotipo MICA-129^{Met/Met} (P=0.06), probablemente debido al número reducido de pacientes incluidos en este grupo (figura 53B).

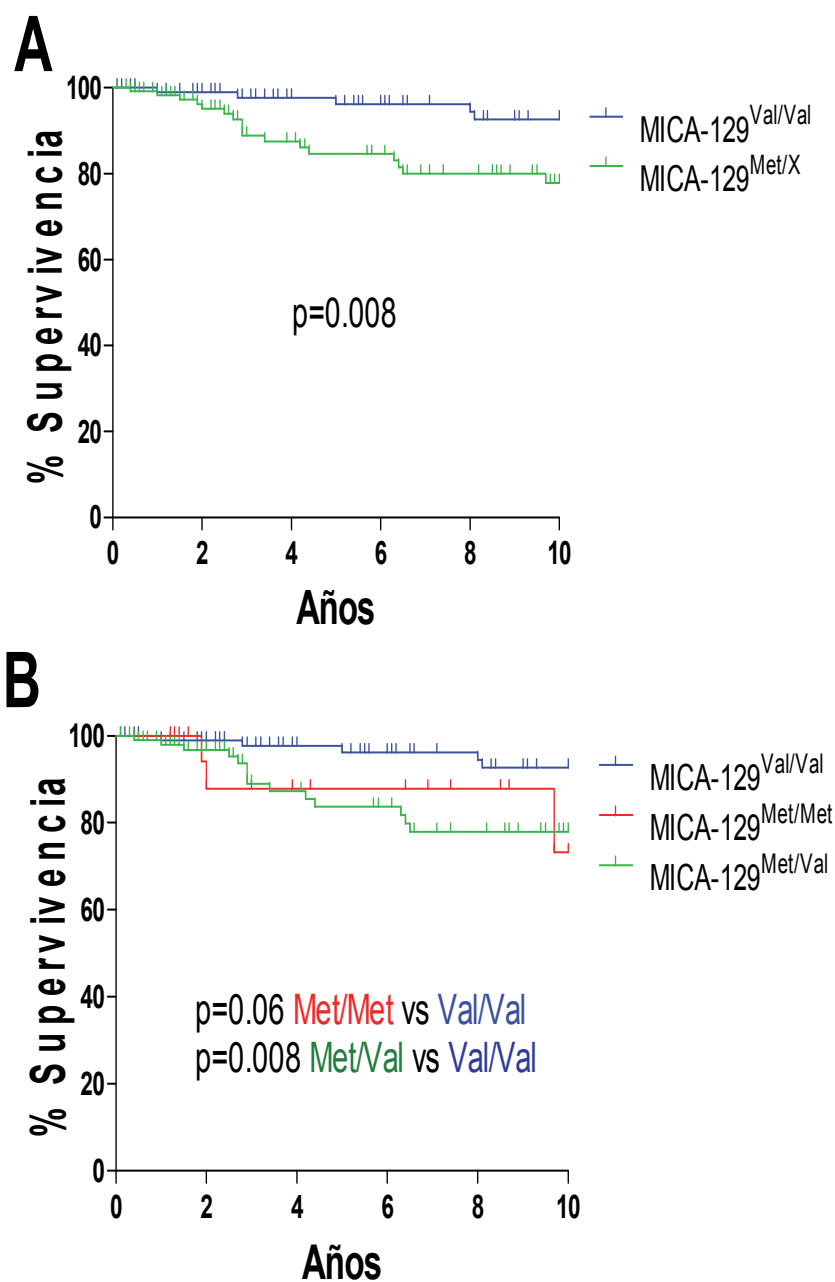


Figura 53. Efecto del dimorfismo MICA-129 en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Presencia (n=129)/ausencia (n=102) de la variante MICA-129^{Met} (B); Pacientes con genotipo MICA-129^{Val/Val} (n=102) (línea azul), MICA-129^{Met/Met} (n=23) (línea roja), MICA-129^{Met/Val} (n=106) (línea verde) (B). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un test de Log-rank.

DISCUSIÓN

1. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES KIR Y LOS LIGANDOS HLA-I EN EL DESARROLLO DEL MELANOMA CUTÁNEO

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia del polimorfismo de los genes KIR y de las combinaciones entre los genes KIR y sus ligandos HLA de clase I en la susceptibilidad y características clínicas al diagnóstico de un grupo de 232 pacientes con melanoma cutáneo provenientes de la región de Murcia. La frecuencia observada de los genes KIR estudiados en el grupo control es similar a la observada previamente en otras poblaciones caucasoides (Middleton and Gonzelez 2010). El estudio individual de los genes KIR en la población de pacientes con melanoma en comparación con el grupo control no ha revelado asociaciones significativas, de la misma manera que otro estudio realizado previamente en una serie de pacientes búlgaros con melanoma (Naumova et al. 2005). Sin embargo, al segregar al grupo de pacientes con melanoma en los dos tipos histológicos de melanoma más representados (MES y MN), se ha observado un efecto protector del gen KIR2DL3 frente al desarrollo de MN y de ulceración de la lesión tumoral en pacientes con diagnóstico de MN. Estos resultados sugieren que los estudios de asociación de los genes KIR con el melanoma cutáneo, deben considerar no sólo los pacientes con melanoma en su conjunto, sino los diferentes subtipos histológicos e incluso las características clínicas al diagnóstico.

Además, el presente estudio ha revelado una asociación entre el genotipo KIR2DL3+/C1+ y la protección frente al desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela en pacientes diagnosticados de MES y MN. Este efecto beneficioso de la combinación KIR2DL3/ligando C1, confirma el papel ventajoso, previamente observado, del grupo de ligandos HLA-C del grupo C1 en el melanoma cutáneo (Campillo et al. 2006a), que según los resultados aquí presentados, podría ser explicado en el contexto de individuos en los que el receptor inhibitor KIR2DL3 coexiste con su ligando C1 específico.

En esta misma línea, también se ha descrito una menor susceptibilidad de los individuos portadores del par KIR2DL3/C1 frente a diferentes patologías infecciosas como la infección por el virus de la hepatitis C (Knapp et al. 2010),

el virus del dengue (Beltrame LM et al. 2013), o la toxoplasmosis ocular (Ayo CM et al. 2016), y autoinmunes, como la colitis ulcerosa (Jones DC, et al 2006).

No obstante, y contrariamente al efecto protector anteriormente descrito, existen estudios que han asociado la combinación KIR2DL3/C1 con una mayor susceptibilidad frente a ciertas patologías infecciosas como la malaria cerebral (Hirayasu, K et al. 2012), y autoinmunes, como la enfermedad de Crohn (Díaz-Peña, R et al. 2016).

Desde un punto de vista funcional, los resultados aquí descritos podrían explicarse de acuerdo con la jerarquía de afinidad previamente publicada entre los receptores KIR expresados en las células NK y sus ligandos HLA de clase I expresados en las células diana (Boyington J. C et al. 2001, Parham P. 2005, Winter C.C et al. 1998). De acuerdo con esta jerarquía, la baja afinidad del receptor KIR2DL3 por sus ligandos C1 podría conducir a una débil inhibición de las células NK, que resultaría en una disminución en el umbral de activación de las mismas y por lo tanto en un ataque más eficiente frente a las células del melanoma.

Sin embargo, el hecho de que los individuos que carecen de KIR2DL3 (homocigotos para KIR2DL2) y que son portadores de ligandos C1 estén más representados en el grupo de pacientes con MN y en el grupo de pacientes con ulceración, podría explicarse por la mayor afinidad de KIR2DL2 que KIR2DL3 por su ligando C1 correspondiente (Moesta, et al. 2008), lo que daría lugar a una fuerte inhibición de las células NK, favoreciendo, de este modo, el desarrollo de la variante más agresiva de la enfermedad. Además, y dado que casi la totalidad de los pacientes de nuestra serie expresan KIR2DL1 (receptor específico para ligandos C2 con una afinidad muy alta), en aquellos individuos homocigotos para KIR2DL2, la inhibición mediada por los receptores KIR2DL2 y KIR2DL1 al interactuar con sus ligandos correspondientes C1 y C2, respectivamente, podría resultar en una mayor inhibición de las células NK, y por tanto, en un ataque menos eficiente frente a las células de melanoma.

Además de lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo también se ha observado una asociación positiva entre KIR2DL5 y el desarrollo de ulceración, que podría ser explicada por la existencia de un alto grado de

desequilibrio de ligamiento entre los genes KIR2DL5 y KIR2DL2 (Parham P. 2005).

Otro hallazgo del presente estudio, es que los individuos homocigotos para ligandos del grupo C2 están más representados en el grupo de pacientes con MES y en el grupo de pacientes que presentan metástasis en ganglio centinela. Esta asociación descrita en los pacientes homocigotos para ligandos C2, ocurre concretamente en aquellos individuos que presentan el gen para el receptor inhibitor KIR2DL1 en ausencia del gen para el receptor activador KIR2DS1 (genotipo KIR2DL1+/S1-C2C2), y no en aquellos que presentan los genes para ambos receptores (genotipo KIR2DL1+/S1+C2C2). Estos resultados, confirman estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo, en los que se describe una mayor susceptibilidad de los individuos C2C2 al desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela (Campillo et al. 2006a), y que, a la vista de los resultados que aquí se exponen, podrían explicarse en el contexto de individuos que presentan el genotipo KIR2DL1+/S1- con ligandos C2 en homocigosis.

En la misma línea que los resultados de este trabajo, también se ha descrito un tiempo de supervivencia libre de metástasis más corto en pacientes C2C2 diagnosticados de melanoma uveal (Maat et al. 2009). Por el contrario, en una serie de pacientes búlgaros se ha descrito una ausencia de asociación del genotipo KIR2DL1+/S1-C2C2 con el desarrollo de melanoma cutáneo (Naumova et al 2005). Las discrepancias entre los resultados aquí expuestos y los del grupo de Naumova, no son inusuales en estudios de asociación entre genotipos KIR/HLA y enfermedad, y podrían deberse a variaciones étnicas y/o a la heterogeneidad de los factores genéticos y ambientales característicos de cada población.

Desde un punto de vista funcional, y de acuerdo con un estudio realizado por el grupo de Cognet (Cognet et al. 2010), la susceptibilidad al desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela en el grupo de pacientes con genotipo KIR2DL1+/S1-/C2C2 aquí descrita, podría explicarse mediante la siguiente hipótesis: en los individuos con genotipo KIR2DL1+/S1- y homocigotos para ligandos del grupo C2, la ausencia del receptor activador KIR2DS1 sería responsable de una mayor inhibición de la actividad anti-

tumoral de las células NK y los linfocitos T CD8+, mediada por la interacción entre el receptor inhibitor KIR2DL1 y sus ligandos C2, lo que daría lugar a un ataque menos eficaz frente a las células tumorales y por tanto, a una mayor susceptibilidad al desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela.

Por el contrario, en las células NK y linfocitos T CD8+ de individuos con genotipo KIR2DL1+/S1+C2C2, la señal de activación transmitida por el receptor KIR2DS1 podría contrarrestar, al menos en parte, la señal de inhibición transmitida por el receptor KIR2DL1 a través de su interacción con ligandos HLA-C del grupo C2 expresados en células de melanoma (Carrega et al 2009; Larrieu et al. 2008; Martayan et al., 1999), lo que, en última instancia, podría resultar en una mayor activación de las células NK y linfocitos T CD8 + y limitar, de este modo, la susceptibilidad frente al melanoma. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesaria la realización de estudios funcionales.

Estos resultados, proporcionan una evidencia indirecta de la vinculación que se ha establecido entre la activación del receptor KIR2DS1 y la fase efectora de las células NK en modelos "*in vitro*" (Chewning et al 2007; Fauriat et al., 2010), y en trasplante haploidéntico de células madre hematopoyéticas (Pende et al 2009; Venstrom et al 2012).

Por otra parte, dada la importancia del epítipo HLA-Bw4 como ligando del receptor KIR3DL1, se consideró de interés valorar su posible influencia en el desarrollo del melanoma. En este sentido, se revisó no solo el posible efecto del epítipo HLA-Bw4, sino también el de su dimorfismo en posición 80 (Thr80/Ile80), no encontrando, en ningún caso, una correlación con la susceptibilidad y/o pronóstico del melanoma. En conjunto, estos resultados son similares a los publicados por el grupo de Naumova (Naumova et al. 2005), donde no se encontraron diferencias significativas respecto al dimorfismo en posición 80 del epítipo HLA Bw4 entre el grupo de pacientes con melanoma y el grupo control.

Por otro lado, debido a que las células NK y linfocitos T CD8+ de 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 e inhibidores, se realizó un estudio para evaluar las poblaciones celulares que expresan receptores activadores KIR2DS e inhibidores KIR2DL en sangre periférica de pacientes con melanoma.

Entre los resultados de dicho estudio, es importante destacar, el aumento observado en el número de células NK que expresan los receptores CD158a/h (KIR2DL1/S1) en pacientes con melanoma en estadios I-II y III (libres de metástasis distales) con respecto al grupo control, hallazgo ya observado con anterioridad por nuestro grupo (Campillo et al. 2006b). Dicho aumento, se observa principalmente en individuos heterocigotos para ligandos HLA-C (C1C2). Por el contrario, las células NK que expresan los receptores CD158b/j (KIR2DL2/2DL3/2DS2), están igualmente representadas en pacientes con melanoma y controles. Además, el aumento de las células NK CD158a/h parece producirse a expensas de clones de células NK que expresan el receptor activador KIR2DS1 en ausencia del receptor inhibidor KIR2DL1 (2DS1+2DL1-), así como de clones de células NK que expresan KIR2DS1 en ausencia de otros receptores KIR con función inhibidora (KIR2DS1+2DL1-2DL2/L3/S2-3DL1-). Estos hallazgos, parecen indicar la activación de una respuesta inmunológica temprana mediada por clones de células NK KIR2DS1+ frente al melanoma.

En esta línea, hay que destacar, que la interacción del receptor activador KIR2DS1 con su ligando HLA-C2 contribuye a la reactividad de las células NK contra las células tumorales “*in vitro*” (C.A. Stewart et al 2005, J.H. Chewning et al 2007, D. Pende et al 2009). También se ha observado que el reconocimiento de HLA-C2 por el receptor activador KIR2DS1 está implicado en la actividad anti-leucémica mediada por células NK alorreactivas (S. Giebel et al 2009; S. Verheyden et al 2005). Además, en alo-trasplantes de células madre hematopoyéticas, las células NK KIR2DS1+ alorreactivas derivadas de donantes desempeñan un papel crucial en el tratamiento de la leucemia aguda mediante la erradicación de los blastos leucémicos (efecto GVL), así como mediante la eliminación de células dendríticas y linfocitos T residuales del receptor, previniendo de este modo la EICH y el rechazo del injerto, respectivamente (E. Marcenaro et al 2011).

Además, también se ha demostrado que los clones de células NK que expresan KIR2DS1 de donantes heterocigotos para HLA-C (C1C2) u homocigotos HLA-C del grupo C1 (C1C1), muestran reactividad frente a células diana que expresan el ligando correspondiente HLA-C2. Por el contrario, en

donantes homocigotos para HLA-C2, se ha observado una disminución de la frecuencia de clones de células NK KIR2DS1 con reactividad frente a HLA-C2 “*In vitro*” (Pittari et al 2013). Estos resultados demuestran que los donantes heterocigotos para HLA-C (C1C2) no expresan suficiente ligando C2 para inducir tolerancia en las células NK KIR2DS1, mientras que los donantes homocigotos para HLA-C2 (C2C2) si expresarían suficiente densidad del ligando específico C2 en el donante para inducir dicha tolerancia (Pittari et al 2013).

Estos hallazgos, junto a los resultados obtenidos en el presente trabajo que indican una mayor susceptibilidad al melanoma y al desarrollo de metástasis en ganglio centinela en individuos con genotipo C2C2, cuyos clones de células NK KIR2DS1 serían hiporreactivos frente a HLA-C2, y también en individuos con genotipo KIR2DL1+/2DS1-C2C2, que carecerían de clones de células NK KIR2DS1, sugieren que dichos clones de células NK pueden jugar un papel importante en la respuesta inmunológica frente al melanoma, así como en el control de su diseminación metastásica.

En el presente estudio, también se ha analizado la influencia de los genotipos de los ligandos HLA-C (C1C1), (C1C2), (C2C2), del gen KIR2DL3 y de los genotipos KIR2DL3+/C1+ y KIR2DL1+/2DS1-C2C2 en la supervivencia a 10 años de los pacientes con melanoma. A diferencia de la predisposición que parecen conferir los genotipos HLA-C C2C2 y KIR2DL1+/2DS1-C2C2 al desarrollo de MES y de metástasis en GC, la supervivencia a 10 años no parece verse afectada por la presencia de los mismos. Del mismo modo, la presencia del gen KIR2DL3, asociada con la protección frente al desarrollo de MN y de ulceración, y la presencia del genotipo KIR2DL3+/C1 asociada con un efecto protector frente al desarrollo de MES y de metástasis en GC, no parecen influir significativamente en la supervivencia, lo que sugiere que las interacciones de los receptores KIR con sus ligandos HLA-C podrían ser importantes en el control de la proliferación tumoral y de la diseminación a los ganglios regionales en los estadios tempranos de la enfermedad, mientras que la evolución a largo plazo de los pacientes y por tanto la supervivencia, podría estar influenciada, además, por otros factores.

En conjunto, los resultados aquí presentados muestran que la ausencia de KIR2DL3 (es decir, la presencia de KIR2DL2 en homocigosis), en pacientes portadores de ligandos C1 podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma nodular y para la progresión a la ulceración de la lesión tumoral. Además, también muestran una asociación entre el genotipo KIR2DL3+/C1+ y la protección frente al desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela en pacientes diagnosticados de MES y MN.

Por otra parte, la presencia de KIR2DL1 en ausencia del gen KIR2DS1, podría ser considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de MES, y para el desarrollo de metástasis en ganglio centinela en individuos homocigotos para ligandos HLA-C del grupo C2 (C2C2).

También es importante destacar el aumento de clones de células NK KIR2DS1+ observado en pacientes con melanoma, que podría estar indicando la activación de una respuesta inmunológica frente al tumor. Además, estos clones de células NK KIR2DS1+ pueden ser altamente reactivos frente a las células de melanoma en individuos homocigotos y heterocigotos para ligandos HLA-C del grupo C1 (C1C1 y C1C2, respectivamente), mientras que serían tolerantes en individuos homocigotos para ligandos HLA-C del grupo C2 (C2C2), lo que podría explicar porque dichos individuos tienen una mayor susceptibilidad al desarrollo de melanoma y de metástasis en GC. Del mismo modo, la ausencia de células NK KIR2DS1+ en los individuos con genotipo KIR2DL1+/2DS1-C2C2, podría dar lugar a un ataque menos eficiente frente a las células tumorales que explicaría la mayor susceptibilidad de dichos individuos a desarrollar melanoma y metástasis en GC.

Por tanto, nuestros resultados, sugieren un papel importante de los clones de células NK KIR2DS1+ en el ataque inmunológico frente al melanoma, al menos en estadios tempranos de la enfermedad.

Los hallazgos relativos al MN son de particular interés, ya que esta variante de melanoma cutáneo es la más agresiva y constituye el segundo subtipo de melanoma más común en la población caucásica (Warycha et al. 2008). Además, los resultados obtenidos respecto al desarrollo de metástasis en ganglio centinela, también son relevantes, debido al creciente interés existente en la identificación de los factores que determinan la susceptibilidad

al desarrollo de metástasis en ganglio linfático centinela como lugar de diseminación inicial del tumor (Cochran et al. 2006).

Por tanto, los resultados aquí expuestos aportan información para la comprensión de los mecanismos inmunológicos que conducen al desarrollo del melanoma y su progresión, y pueden ser de interés para predecir la susceptibilidad y el pronóstico del mismo, e incluso, para abrir nuevas vías terapéuticas con el objetivo de controlar la progresión del melanoma, teniendo en consideración los receptores KIR como dianas para la intervención inmune mediante la regulación sus funciones inhibitoras y/o activadoras, así como la utilización de células NK KIR2DS1+ mediante estrategias de terapia celular adoptiva para combatir el melanoma.

2. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DE LA REGIÓN GÉNICA NKC EN EL MELANOMA CUTÁNEO

En el presente trabajo, se ha investigado, por primera vez, la influencia del polimorfismo de la región génica NKC en el melanoma cutáneo. Se ha estudiado una serie de 8 SNPs, 7 de los cuales (NKC-3, 4, 7, 9, 10, 11,12) se localizan en el gen NKG2D y uno de ellos (NKC-17) en la región promotora del gen NKG2A. Algunos de estos SNPs han sido asociados en la literatura con susceptibilidad y/o protección a múltiples patologías, como enfermedades infecciosas, autoinmunes y diferentes tipos de cáncer (Má J et al 2010, Piotrowski P et al 2012, Kabalak G et al 2010, Ghobadzadeh S et al 2013, Roszak A et al 2012, Melum E et al 2008). En el ámbito de las enfermedades tumorales, se ha descrito una asociación entre el genotipo CC del SNP NKC-3 y una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama en un grupo de pacientes de la población iraní de Yazd (Ghobadzadeh S et al 2013), y entre la variante 72Thr del SNP NKC4 (rs2255336) y un efecto protector frente a la progresión a estadios avanzados de cáncer cervical en un estudio realizado en un grupo de mujeres polacas (Roszak A et al 2012). Otros dos SNPs del gen NKG2D (rs11053781 y rs2617167) han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollo de colangiocarcinoma en una cohorte europea de pacientes con colangitis esclerosante primaria (Melum E et al 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se ha observado una asociación entre los SNPs de la

región NKC estudiados y el riesgo de desarrollar melanoma cutáneo. Del mismo modo que los resultados del presente estudio, existe otro trabajo que describe una ausencia de asociación de los polimorfismos de NKG2D con el desarrollo de colangiocarcinoma en una cohorte de pacientes procedente de EEUU (Chaiteerakij R et al. 2012).

Por otra parte, el análisis de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de la región NKC estudiados, ha permitido identificar dos bloques de haplotipos, el primer bloque o hb-1, constituido por los SNPs NKC-3, NKC-7, NKC-11 y NKC-12, y el segundo bloque o hb-2, constituido por los SNPs NKC-4, NKC9 y NKC-10. A diferencia de lo descrito en la población japonesa (Hayashi et al 2006), donde el SNP NKC-17 se encuentra asociado con los SNPs NKC-3, NKC-7, NKC-11 y NKC-12, en la población estudiada en el presente trabajo, no se ha encontrado una asociación de NKC-17 con el resto de los SNPs estudiados. Por lo tanto, los haplotipos del bloque hb-1 detectados en nuestra población difieren de los haplotipos descritos en la población japonesa (Hayashi et al 2006), lo que apunta a la existencia de variaciones étnicas en la composición de dichos haplotipos. Sin embargo, los haplotipos más frecuentes del bloque hb-2 en nuestra población si coinciden con los descritos en la población japonesa.

El análisis de los dos haplotipos mayoritarios de los bloques hb-1 y hb-2, no mostró asociación con el riesgo de desarrollar melanoma en nuestra población, sin embargo la frecuencia de los haplotipos NK-2hb1 y NK-2hb2, ambos previamente relacionados con una alta capacidad citotóxica de las células NK y linfocitos T CD8+ (Hayashi et al 2006), se encuentra disminuida en el grupo de pacientes con melanoma. Además, también se ha observado un menor riesgo de incidencia de melanoma en los individuos con genotipo NK-1/NK-2 y NK-2/NK-2 del bloque hb-2. Estos resultados, indican que la presencia del haplotipo que ha sido asociado con una alta capacidad citotóxica (NK-2 del bloque hb2), podría estar asociada con una mayor protección frente al desarrollo de melanoma. Para confirmar estos resultados, sería necesario realizar estudios en series más amplias de pacientes, así como estudios funcionales para demostrar que el haplotipo NK-2 del bloque hb2 se asocia a una mayor capacidad citotóxica de las células NK *“in vitro”*, lo que podría

explicar el efecto protector de dicho haplotipo frente al melanoma. En esta misma línea, existen otros estudios que han descrito una asociación entre el haplotipo de alta citotoxicidad HNK1 (equivalente al haplotipo NK-2hb1 de este estudio) y una mejor evolución clínica de los receptores de trasplantes de médula ósea HLA compatibles de donante no relacionado (Espinoza JL et al 2009), y también con un riesgo reducido de desarrollar cáncer colorectal (Furue H et al 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se ha observado una asociación entre la presencia o ausencia de los dos haplotipos más frecuentes de ambos bloques (hb1 y hb2), y la supervivencia de los pacientes con melanoma.

Estudiando otros haplotipos menos frecuentes en nuestra población, se observó una asociación del haplotipo NK-3 del bloque hb-2, constituido por una G en el SNP NKC-4, una A en NKC-9 y una T en NKC-10, con un mayor riesgo de desarrollar melanoma cutáneo. No obstante, y debido a la baja frecuencia del haplotipo NK-3 del bloque hb-2 en nuestra población, es necesaria la realización de estudios con poblaciones más amplias para confirmar que dicho haplotipo está asociado con un mayor riesgo de desarrollar melanoma cutáneo. Además, también sería de interés la realización de estudios funcionales para determinar si dicho haplotipo podría estar asociado con una capacidad citotóxica reducida de las células NK y linfocitos T CD8+, que explicaría la asociación observada entre este haplotipo y la susceptibilidad a desarrollar melanoma cutáneo.

Por tanto, nuestros resultados muestran una ausencia de asociación entre los polimorfismos de nucleótido simple de la región génica NKC, analizados individualmente, y el riesgo de desarrollar melanoma cutáneo en nuestra población. Sin embargo, al estudiar los haplotipos de SNPs de la región NKC, se observa una tendencia a la protección frente al melanoma en aquellos individuos portadores del haplotipo NK-2 del bloque hb-2, previamente asociado con una alta actividad citotóxica de las células NK y linfocitos TCD8+, así como una asociación entre el haplotipo NK-3 del bloque hb-2 y un mayor riesgo de desarrollar melanoma cutáneo. No obstante, estos resultados tienen que ser confirmados con series más amplias.

En el presente trabajo también se ha estudiado la expresión en membrana del receptor NKG2D en células NK CD56^{dim}, células NK CD56^{bright}, y en linfocitos T CD8+ de sangre periférica en pacientes con melanoma en los estadios I-II (ausencia de metástasis en GC), estadio III (presencia de metástasis en ganglio centinela), y controles sanos. En dicho estudio se observó un incremento en la expresión de NKG2D en células NK CD56^{dim}, células NK CD56^{bright} y linfocitos T CD8+ de pacientes con melanoma, incluyendo pacientes en estadio I-II y estadio III, con respecto al grupo control. Además, el incremento observado en la expresión de NKG2D fue mayor en pacientes en estadio III que en aquellos pacientes en estadios I-II.

NKG2D es un receptor de activación primario en las células NK responsable de inducir la actividad citolítica antitumoral. Su expresión es constitutiva en las células NK en reposo pero se ha observado que puede aumentar en un estado de activación (López-Larrea C et al, 2008). Así, el incremento en la expresión de NKG2D aquí descrito podría indicar una activación de las células NK y linfocitos T CD8+ en sangre periférica de pacientes con melanoma en estadios tempranos de la enfermedad. Estos resultados, junto con los descritos previamente en células NK de pacientes con melanoma metastásico en estadios avanzados (estadio IV), en los que se ha observado una disminución en la expresión de NKG2D que, además, ha sido asociada con una alteración significativa en la actividad citotóxica de las células NK de dichos pacientes (Konjevic G et al, 2007), sugieren la presencia de una respuesta inmunitaria mediada por células NK y linfocitos T CD8+ en fases tempranas de la enfermedad, mientras que en etapas tardías de la misma se podría favorecer el escape tumoral.

Además, se ha observado en experimentos realizados "*In vitro*" que la expresión de NKG2D en células NK obtenidas a partir de pacientes con melanoma metastásico aumenta en respuesta a la estimulación con diversas citocinas como IL-2, IL-12, IL-15 o IFN- γ , y que este incremento en la expresión de NKG2D se correlaciona con un aumento en la actividad y, en algunos casos, en la citotoxicidad de las células NK de los pacientes (Konjevic G et al, 2010). De hecho, ciertos agentes inmunomoduladores como la IL-2 y el IFN- γ se han empleado terapéuticamente en pacientes con melanoma metastásico,

obteniéndose efectos beneficiosos y mejorando la respuesta inmunológica antitumoral (Konjevic G et al, 2010).

3. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL GEN MICA EN EL MELANOMA CUTÁNEO.

En el presente trabajo, también se ha investigado por primera vez la influencia del polimorfismo en los dominios extracelulares de la proteína MICA en el melanoma cutáneo. Se ha detectado un total de 17 alelos MICA (ver tabla 49 de resultados), cuyas frecuencias en el grupo control son similares a las descritas previamente en otras poblaciones caucasoides (Petersdorf et al 1999, Hughes et al 2005, Muñoz-Saá et al 2006). Además, se ha observado una serie de asociaciones positivas y negativas entre algunos de los alelos MICA estudiados y el desarrollo de melanoma cutáneo. En un primer análisis, se observó una asociación positiva entre el alelo MICA*009 y el desarrollo de melanoma cutáneo maligno. Estudios inmunológicos relacionados, como los que investigan la enfermedad de Behçet, también han encontrado una asociación positiva entre MICA *009 y el desarrollo de la enfermedad (Mizuki et al 2007, Hughes et al 2005, Muñoz-Saá et al 2006); sin embargo, en dichos estudios, la asociación observada se explica por la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento con el alelo HLA-B*51.

Así, y en base al desequilibrio de ligamiento previamente descrito entre los alelos MICA *009 y HLA-B*51 (Petersdorf et al 1999, Gao et al 2006, Lucas et al 2008), se realizó un análisis adicional con la finalidad de estudiar la posible asociación entre la combinación MICA*009/B*51 y el desarrollo de melanoma cutáneo. En dicho análisis, se observó la existencia de una alta asociación entre los alelos MICA *009 y HLA-B*51 tanto en la población de pacientes con melanoma como en la población de controles sanos. Dicha asociación fue más fuerte en el grupo de pacientes que en el grupo control, lo que sugiere que la combinación MICA*009/B*51 puede estar asociada con una mayor susceptibilidad al desarrollo de melanoma cutáneo. Sin embargo, esto no se ha confirmado tras aplicar un modelo de regresión logística multivariante, lo que sugiere una asociación entre el alelo MICA *009 y la susceptibilidad al

melanoma cutáneo. No obstante, se requieren estudios con series más amplias para confirmar dicha asociación. Otro hallazgo de este estudio, incluye una disminución de la frecuencia de MICA*002 en pacientes con melanoma, lo que sugiere un efecto protector de dicho alelo frente al desarrollo de melanoma cutáneo. No obstante, se requieren estudios con series más amplias para confirmar dicha asociación. En esta línea, cabe destacar, que se ha descrito un efecto protector de MICA*002 en otras patologías como la colangitis esclerosante primaria (Norris et al 2001).

Por otro lado, el estudio del dimorfismo en la posición 129 del dominio extracelular α de MICA, no reveló diferencias significativas entre los pacientes con melanoma y los individuos sanos, a diferencia de lo que se ha observado en otras patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal (López-Hernández et al 2010), la enfermedad injerto contra huésped (Boukouaci et al 2009), la enfermedad de Behçet (Muñoz-Saá et al 2006) y el cáncer nasofaríngeo (Douik et al 2009), donde el genotipo MICA-129 ha sido descrito como un biomarcador de susceptibilidad y/o protección a la enfermedad. También se han publicado estudios caso/control que han analizado el polimorfismo MICA a nivel transmembrana, donde no se ha identificado una asociación entre dicho polimorfismo y la aparición de cáncer de piel tipo melanoma (Kennedy et al 2002, Metzelaar-Blok et al 2005).

Esta falta de asociación entre el gen MICA y el desarrollo de melanoma, ha sido confirmada en estudios de asociación del genoma completo (GWAS), donde se han identificado algunas variantes genéticas asociadas con un mayor riesgo de desarrollar melanoma (Bishop et al 2009, MacGregor et al 2011, Brown et al 2008) que se encuentran en regiones (16q24, 11q14-q21, 9p21, 1q21.3 y 20q11.22) distintas de la región donde se localiza el gen MICA (6p21.3).

4. MICA SOLUBLE EN EL MELANOMA CUTÁNEO.

Es conocido que los ligandos de NKG2D expresados en las células tumorales estimulan la actividad citotóxica de células NK y células T gamma/delta y coestimulan respuestas de células T (Bauer S et al 1999; Das H et al 2001; Rincón-Orozco B et al 2005). Sin embargo, muchas células tumorales liberan ligandos de NKG2D para evadir el ataque del sistema inmunitario mediante diversos mecanismos, como el “splicing” alternativo, la rotura mediada por PLC-PI, la liberación proteolítica o la secreción en exosomas. En este sentido, se ha descrito que las moléculas MICA, como ligandos de NKG2D, pueden ser solubilizadas mediante los mecanismos antes indicados. De hecho, se han encontrado niveles aumentados de MICA en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes, infecciones virales como la infección por HIV (Matusali G et al 2013) y cáncer. Así mismo, también se ha establecido una correlación entre los niveles de MICA en suero y la estratificación clínica y los estadíos de la enfermedad en varios tipos de cáncer (Holdenrieder S et al 2006) y en el carcinoma de células escamosas (Tamaki et al 2008).

En lo referente al melanoma cutáneo, aunque se ha observado un aumento de los niveles de MICA soluble en pacientes de melanoma, dichos niveles no han sido asociados con el pronóstico de los mismos (Paschen A et al 2009). A diferencia de lo observado en este estudio, en el presente trabajo, no observamos diferencias significativas entre los niveles de MICA soluble en el plasma de los pacientes con melanoma con respecto a los individuos sanos. Sin embargo, se confirma la falta de asociación entre los niveles de MICA soluble y el pronóstico de la enfermedad.

Por el contrario, existen otros ligandos de NKG2D que si se han asociado con el pronóstico de los pacientes con melanoma, como es el caso de ULBP2, cuya forma soluble en suero se ha encontrado aumentada en pacientes en estadio III respecto a aquellos pacientes que se encuentran en los estadíos I-II, pudiendo ser útil como indicador de un peor pronóstico en pacientes con melanoma en estadíos tempranos (estadíos I-III) (Paschen A et al 2009).

Al estudiar los niveles de MICA soluble de los pacientes de melanoma en función del dimorfismo MICA-129, se observó una mayor concentración de MICA soluble en el plasma de pacientes con melanoma que presentan la variante MICA-129Met. En este sentido, se ha descrito en ensayos “*in vitro*” con líneas celulares de melanoma, que el dimorfismo MICA-129 afecta a la densidad de expresión de MICA en la membrana plasmática, de manera que la variante MICA-129Met es retenida intracelularmente en mayor proporción y también es más susceptible a la liberación de la membrana plásmática que la variante MICA-129Val (Isernhagen A, 2016a). Ambos procesos, parecen limitar la expresión de los ligandos MICA-129Met (que tienen una gran avidéz de unión a NKG2D) en la superficie celular. Estos hallazgos, van en la misma línea que los resultados del presente trabajo, en los que se observa un mayor nivel de MICA soluble en el plasma de pacientes de melanoma que presentan la variante MICA-129Met. Adicionalmente, también se describe una menor supervivencia de los pacientes con melanoma que presentan la variante MICA-129Met. Esta menor supervivencia podría explicarse, en primer lugar, por la mayor retención intracelular, así como la mayor liberación de los ligandos MICA-129Met, que daría lugar a una baja expresión de moléculas MICA en la membrana de las células de melanoma, lo que conduciría a una menor activación, mediada a través del receptor NKG2D, de las células NK y linfocitos TCD8+. Además, se ha demostrado que una expresión elevada de los ligandos MICA-129Met sobre las células de melanoma, también podría conducir a una regulación negativa de la expresión del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T CD8+, que daría lugar a una menor activación y coestimulación de las mismas, respectivamente (Isernhagen A, 2016b) (ver Figura 23A).

Estos dos fenómenos, podrían dar lugar a un ataque menos eficiente de dichas células citotóxicas frente a las células del melanoma, facilitando el escape tumoral, y una peor supervivencia de los individuos que presentan la variante MICA-129Met.

Nuestros resultados, por tanto, no confirman la presencia, descrita en estudios previos, de niveles aumentados de proteína MICA soluble en el suero de pacientes de melanoma. Sin embargo, revelan la existencia de mayores niveles de MICA soluble en el plasma de pacientes con melanoma que

presentan la variante MICA-129Met, confirmando estudios previos realizados “*in vitro*” con líneas celulares de melanoma, así como una asociación entre la variante MICA-129Met y una peor supervivencia a 10 años de los pacientes de melanoma, lo que sugiere que dicha variante podría estar asociada con una respuesta inmunológica menos eficiente contra el melanoma que favorecería la progresión del mismo.

CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

- 1.** El genotipo KIR2DL3+/C1+ se asocia a protección frente al desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela en pacientes diagnosticados de MES y MN.

- 2.** La ausencia de KIR2DL3 (KIR2DL2 en homocigosis) en pacientes portadores de ligandos C1 podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma nodular y para la progresión a la ulceración de la lesión tumoral.

- 3.** El genotipo KIR2DL1+2DS1-C2C2 podría ser considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma y de metástasis en ganglio centinela en individuos diagnosticados de MES.

- 4.** El aumento de clones de células NK KIR2DS1+ observado en pacientes de melanoma sugiere un papel importante de dicha población celular en la respuesta inmunitaria frente al melanoma cutáneo.

- 5.** Los SNPs de la región NKC estudiados individualmente no parece presentar asociación con el desarrollo y/o pronóstico del melanoma cutáneo.

- 6.** El haplotipo NK-3 del bloque hb-2 de la región génica NKC parece estar asociado con un mayor riesgo de desarrollo de melanoma cutáneo.

- 7.** La expresión aumentada del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T CD8+ observada en los pacientes con melanoma cutáneo parece indicar un estado de activación de las mismas.

- 8.** El alelo MICA*009 parece estar asociado con un mayor riesgo de desarrollo de melanoma cutáneo. No obstante, se requieren estudios con series más amplias para confirmar esta asociación.

9. El dimorfismo en posición 80 del gen MICA no parece estar asociado con el desarrollo del melanoma cutáneo.

10. La variante MICA-129Met está asociada con un mayor nivel de MICA soluble en plasma y una peor supervivencia de los pacientes de melanoma cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, et al. "Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor". *Journal of immunology*. 2005; 175(12): 7791-5.

Al Omar S, Middleton D, Marshall E, Porter D, Xinarianos G, Raji O, et al. "Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors". *Human Immunology*. 2010; 71(10): 976–81.

Alter G, Rihn S, Walters K, Nolting A, Martin M, Rosenberg E, et al. "HLA class I subtype dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute HIV-1 infection". *J Virol*. 2009; 83(13): 6798–805.

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): 668-74.

Álvarez-Mon Soto F, Camacho Martínez F, Díaz Pérez JL, Díaz Rubio E, González Larriba JL, Guillén Porta V, et al. "Panorámica actual del melanoma". *Madrid: Acción Médica*. 1997.

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.

Andre P, Castriconi R, Espeli M, Anfossi N, Juarez T, Hue S, et al. "Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors". *European Journal of Immunology*. 2004; 34(4): 961-71.

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.

Anichini A, Vegetti C, Mortarini R. "The paradox of T cell mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma". *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2004; 53(10): 855-64.

Aranda-Romo S, García-Sepulveda CA, Comas-García A, Lovato-Salas F, Salgado-Bustamante M, Gómez-Gómez A, et al. "Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in severe A (H1N1) 2009 influenza infections". *Immunogenetics*. 2012; 64(9): 653-62.

Ayo CM, Frederico FB, Sisqueira Camargo R, et al. "Ocular toxoplasmosis: susceptibility in respect to the genes encoding the KIR receptors and their HLA class I ligands". *Scientific reports*. 2016; 6:36632.

Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. "Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D". *Journal of Immunology*. 2004; 173(2): 1078-84.

Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. "A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I gene". *Proceedings of Natural Academy of Sciences of USA*. 1994; 91(14): 6259-63.

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". *Journal of Immunology*. 1998; 160(11): 5239-45.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. "Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System". *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 3622-34.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification". *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(36): 6199-206.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. "Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases". *Journal of Clinical Oncology*. 28(14): 2452-2459.

Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. "The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense". *Annual Reviews of Genomics and Human Genetics*. 2006; 7: 277-300.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA". *Science*. 1999; 285(5428): 727-9.

Becker S, Kiessling R, Lee N, Klein G. "Modulation of sensitivity to natural killer cell lysis after in vitro explantation of a mouse lymphoma". *J Natl Cancer Inst*. 1978; 61:1495-8.

Beltrame LM, Sell AM, Moliterno RA, et al. "Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil" *Tissue antigens*. 2013; 82:397-404.

Bernal-Pérez M. "Epidemiología del melanoma". 2005.

Besson C, Roetyneck S, Williams F, et al. "Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study". *Plos One*. 2007; 2(5): e406.

Biassoni R, Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C, Sivori S, et al. A. "Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules". *European Journal of Immunology*. 1997; 27(12): 3095-9.

Bishop DT, Demenais F, Iles MM, et al. "Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk". *Nature Genetics*, 2009; 41(8): 920–925.

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.

Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, et al. "Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells". *Molecular Immunology*. 2002; 38(9): 637–660.

Boukouaci W, Busson M, Peffault de Latour R, Rocha V, Suberbielle C, Bengoufa D, et al. "MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease". *Blood*. 2009; 114(25): 5216-24.

Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy J-P, Tsoukas CM, et al. "Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals". *AIDS*. 2008; 22:595–9.

Boutet P, Aguera-Gonzalez S, Atkinson S, et al. "Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF- α -converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein". *Journal of Immunology*. 2009; 182(1): 49–53.

Boyington, J. C. & Sun, P. D. "A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors". *Mol. Immunol.* 2001; 38: 1007–1021.

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA et al. "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C". *Nature*. 1998; 391(6669): 795–9.

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.

Breslow A. "Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma". *Ann Surg*. 1975; 182(5): 572–575.

Brown KM, MacGregor S, Montgomery GW, et al. "Common sequence variants on 20q11.22 confers melanoma susceptibility". *Nature Genetics*. 2008; 40(7): 838–40.

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". *Journal of immunology*. 2001; 167(10): 5824-31.

Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T, et al. "Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor". *Immunity*. 1996; 4(1): 77-85.

Caligiuri MA. "Human natural killer cells". *Blood*. 2008; 112(3): 461-9.

Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Muro M, Moya-Quiles R, Marín LA, Montes-Ares O, et al. "HLA class I and class II frequencies in patients with cutaneous malignant melanoma from south-eastern Spain: the role of HLA-C in disease prognosis". *Immunogenetics*. 2006a; 57(12): 926–933.

Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Moya-Quiles MR, Marín LA, Muro M, Guerra N, et al. "Natural killer receptors on CD8 T cells and Natural Killer cells from different HLA-C phenotypes in melanoma patients". *Clinical Cancer Research*. 2006b; 12(16): 4822–83.

Cao W, Xi X, Hao Z et al. "RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity". *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(26): 18922–8.

Carrega P, Pezzino G, Queirolo P, Bonaccorsi I, Falco M, Vita G, et al. "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): 8132.

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". *The Journal of experimental medicine*. 2005; 201(7): 1069-75.

Casado JG, Soto R, De la Rosa O, Peralbo E, del Carmen M-VM, Rioja L, et al. "CD8 T-cells expressing NK associated receptors are increased in melanoma patients and display an effector phenotype". *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2005; 54(12): 1162–71.

Casado JG, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, et al. "Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines". *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2009; 58(9): 1517-26.

Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. "Antitumor immunity and cellular cancer therapies". *Med Sci (Paris)*. 2003; 19 (1): 43-53.

Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M. "NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80". *Journal of Experimental Medicine*. 1994; 180(4): 1235-1242.

Chewning J.H, Gudme C.N, Hsu K.C, Selvakumar A, Dupont B. "KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro". *Journal of Immunology*. 2007; 179(2): 854-68.

Childhood Hematopoietic Cell Transplantation. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Date last modified 12/12/2014. Available at: <http://cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childHCT/HealthProfessional>.

Chouaib S, Thiery J, Gati A, Gerra N, El Behi M, Dorothée G, et al. "Tumor escape from killing: Role of killer inhibitory receptors and acquisition of tumor resistance to cell death". *Tissue Antigens*. 2002; 60(4): 273–281.

Choy M-K, Phipps ME. "MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease". *Trends in Molecular Medicine*. 2010; 16(3): 97-106.

Chudnovsky Y, Khavari PA, and Adams AE. "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics". *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115(4): 813–24.

Cicone E, Pende D, Viale O, Di Donato C, Tripodi G, Orengo AM, et al. "Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans". *The Journal of experimental medicine*. 1992; 175(3): 709-18.

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.

Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma". *Cancer*. 1996; 77(7): 1303-10.

Cochran AJ, Huang R-R, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. "Tumour induced immune modulation of sentinel lymph nodes". *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6(9): 659–670.

Cognet C, Farnarier C, Gauthier L, Frassati C, André P, Magérus-Chatinet A, et al. "Expression of the HLA-C2-specific activating Killer Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells". *Clinical Immunology*. 2010; 135(1): 26-32.

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". *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1993; 90(24): 12000–4.

Colonna M, Samaridis J. "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells". *Science*. 1995; 268: 405–8.

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.

Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010; 116: 2411–9.

Cooper MA, Fehniger TA and Caligiuri MA. "The biology of human natural killer-cell subsets". *Trends in Immunology*. 2001(a); 22(11): 633-40.

Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaehri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset". *Blood*. 2001(b); 97: 3146-51.

Coudert JD, Held W. "The role of the NKG2D receptor for tumor immunity". *Seminars in Cancer Biology*. 2006; 16(5): 333–43.

D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. "Molecular cloning of NKB1: a natural killer cell receptor for HLA-B allotypes". *Journal of Immunology*. 1995; 155(5): 2306- 2310.

Das H, Groh V, Kuijl C et al. "MICA engagement by human Vc2Vd2 T cells enhances their antigen-dependent effector function". *Immunity*. 2001; 15(1): 83–93.

Diaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Moro-García MA, et al. "Significant association of the KIR2DL3-HLA-C1 genotype with susceptibility to Crohn's disease". *Human immunology*. 2016; 77(1): 104-9.

Douik H, Ben Chaaben A, Attia Romdhani N, et al. "Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population". *Human Immunology*. 2009; 70(1): 45-8.

Draghi M, Yawata N, Gleimer M, Yawata M, Valiante NM, Parham P. "Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I". *Blood*. 2005; 105(5): 2028-35.

Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, Guinan KJ, Hagan R, Consortium IHR, et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:5736–41.

Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R. "Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans". *Immunogenetics*. 2007; 59(1): 1–15.

Eagle RA, Trowsdale J. "Promiscuity and the single receptor: NKG2D". *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7(9): 737-44.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. "Melanoma of the Skin: American Joint Committee on Cancer Staging Manual". 2010; 7th (Eds), Springer, New York. p.325.

E. Marcenaro, S. Carlomagno, S. Pesce, M. Della Chiesa, A. Moretta, S. Sivori. "Role of alloreactive KIR2DS1+ NK cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation" *Journal of leukocyte biology*. 2011; 90(4): 661-67.

Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, et al. "Japan Marrow Donor Program. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies". *Haematologica*. 2009; 94(10): 1427-34.

Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. "Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect". *Blood*. 2002; 100: 1935-47.

Farag SS, Caligiuri MA. "Human natural killer cell development and biology". *Blood reviews*. 2006; 20(3): 123-37.

Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaëlsson J . "Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors". *Blood*. 2010; 115(6): 1166–74.

Fernandez-Messina L, Ashiru O, Boutet P et al. "Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands". *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(12): 8543–51.

Fontaine D, Parkhill W, Wenda G, Noreen W. "Partial Regression of Primary Cutaneous Melanoma: Is There an Association with Sub-Clinical Sentinel Lymph Node Metastasis?". *American Journal of Dermatopathology*. 2003; 25(5): 371-76.

Freud AG, Caligiuri MA. "Human natural killer cell development". *Immunol Rev*. 2006; 214: 56-72.

Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, et al. "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". *Journal of Immunology*. 2008; 180(7): 4606-14.

Fuertes MB, Rossi LE, Peralta CM, Cabrera HN, Allevato MA, Zwirner NW. "Premalignant quiescent melanocytic nevi do not express the MHC class I chain-related protein A". *Medicina (Buenos Aires)*. 2011; 71(4): 357-60.

Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, Hiraki A, Suzuki T, Yatabe Y, et al. "Decreased risk of colorectal cancer with the high Natural-Killer (NK)-cell activity NKG2D genotype in Japanese". *Carcinogenesis*. 2008; 29(2): 316-20.

Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M. "Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two north American populations". *Human Immunology*. 2006; 67(3): 152-8.

García G, del Puerto F, Pérez AB, Sierra B, Aguirre E, Kikuchi M, et al. "Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection". *Human Immunology*. 2011; 72(10): 904-7.

Garibyan, L. and D. E. Fisher. "How sunlight causes melanoma". *Curr Oncol Rep*. 2010; 12(5): 319-26.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, et al. "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors". *Immunology Today*. 1997; 18(2): 89–95.

García-León JA, Pinto-Medel MJ, García-Trujillo L, López-Gómez C, Maldonado-Sanchez R, Fernández-Fernández Ó, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients. *Mol Immunol*. 2011; 48:1896–902.

Ghobadzadeh S, Shams A , Eslami G , Mirghanizadeh A. "Investigation of NKG2D rs1049174G>C Gene Polymorphism in Women with Breast Cancer". *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2013; 21(3): 291-299.

Giebel S, Nowak I, Dziaczkowska J, et al. "Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation". *European Journal of Haematology*. 2009; 83(4): 343-356.

Goldstein, A. M. and M. A. Tucker. "A piece of the melanoma puzzle". *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(20): 1486-7.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. "Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation". *Nature*. 2002; 419(6908): 734-8.

Grubic Z, Stingl K, Zunec R, Car H, Cecuk-Jelicic E, Brkljacic-Kerhin V. "Linkage disequilibria between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population". *Tissue Antigens* 2006; 69: 86-94.

Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y and Nakachi K. "Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance". *Cancer research*. 2006; 66(1): 563-70.

Heinzel 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 immunology immunotherapy*. 2001; 49(12): 671-8.

Held W, Coudert JC, Zimmer J. “The NK cell receptor repertoire: Formation, adaptation and exploitation”. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15(2): 233–237.

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.

Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. “Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors.II. Characterization of effector cells”. *Int J Cancer*. 1975; 16:230–9.

Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, et al. “Significant association of KIR2DL3 HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for coevolution of KIR and HLA”. *Plos pathogens*. 2012; 8(3): e1002565.

Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. “Soluble MICA in malignant diseases”. *International Journal of cáncer*. 2006; 118(3): 684-7.

Hollenbach JA, Necedal I, Ladner MB, Single RM, Trachtenberg EA. “Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene content variation in the HGDP-CEPH populations”. *Immunogenetics*. 2012; 64(10): 719–37.

Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanchez FO. “Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis”. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2005; 125(4): 721-730.

Hou Y-F, Zhang Y-C, Jiao Y-L, Wang L-C, Li J-F, Pan Z-L, et al. “Disparate distribution of activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with systemic lupus erythematosus”. *Lupus*. 2010; 19:20–6.

Hughes EH, Collins RW, Kondeatis E, et al. "Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behçet's disease in Caucasian patients". *Tissue Antigens*. 2005; 66(3): 195-9.

Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP Jr, Takahashi Y, et al. "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.

Isernhagen A, Schilling D, Monecke S, et al. "MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA" *Immunogenetics*. 2016a; 68(2): 109-23.

Isernhagen A, Malzahn D, Bickeböller H, Dressel R. "Impact of the MICA 129Met/Val dimorphism on NKG2D-mediated biological functions and disease risks". *Front immunol*. 2016b; 7:588.

Jacobs R, Weber K, Wendt K, Heiken H, Schmidt RE. "Altered coexpression of lectin-like receptors CD94 and CD161 on NK and T cells in HIV patients". *Journal of Clinical Immunology*. 2004; 24(3): 281-6.

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.

Jones DC, Edgar RS, Ahmad T. "Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility" *Genes immunol*. 2006; 7(7): 576-82.

Jovic ÄV, Konjevi ÄG, Radulovi ÄS, Jeli ÄS, Spuzi ÄI. "Impaired perforin-dependent NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma". *Tumori*. 2001; 87(5): 324-9.

Kabalak G, Thomas RM, Martin J, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, de Ramón E, et al. "Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations". *Human Immunology*. 2010; 71(1): 74-78.

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.

Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. "MHC class I alloantigen specificity of Ly-49 + IL-2-activated natural killer cells". *Nature*. 1992; 358: 66–70.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immunodefence strategy". *Nature*. 1986; 319: 675–8.

Kasahara M, Yoshida S. "Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family". *Immunogenetics*. 2012; 64(12): 855-67.

Kennedy C, Naipal A, Gruis NA, Struijk L, ter Schegget J, Willemze R, et al. "MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer". *Journal of Investigative Dermatology*. 2002; 118(4): 686-91.

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. "HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection". *Science*. 2004; 305(5685): 872-4.

Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural killer cells in the mouse .I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype". *Eur J Immunol.* 1975; 5:112–7.

Knapp S, Warshaw U, Hegazy D, Brackenbury L, Guha IN, Fowell A, et al. "Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulinlike receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus". *Hepatology.* 2010; 51(4): 1168–1175.

Konjević G, et al. "Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients". *Clinical and Experimental Metastasis.* 2007; 24: 1–11.

Konjević G, Martinovic KM, Jurisic V, Babovic N, Spuzic I. "Biomarkers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells". *Biomarkers.* 2009; 14(4): 258–270.

Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Babović N. "In-vitro IL-2 or IFN- α -induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients". *Melanoma Res.* 2010; 20(6): 459-467.

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.

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).

Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. "Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function". *Journal of Immunology*. 1986; 137(9): 2735-9. (b).

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.

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)". *Journal of immunology*. 1991; 146(12): 4421-6.

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". *Journal of immunology*. 1994; 153(6): 2417-28.

Lanier LL. "NK cell receptors". *Annual Reviews of Immunology*. 1998; 16: 359-93.

Lanier LL. "Natural killer cell receptor signaling". *Curr Opin Immunol*. 2003; 15(3): 308-14.

Lanier LL. "NK cell recognition". *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 225-74.

Larrieu P, Renaud V, Godet Y, Jotereau F, Fonteneau JF. "A HLA-Cw*0701 restricted melan-A/MART1 epitope presented by melanoma tumor cells to CD8+ tumor infiltrating lymphocytes". *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2008; 57(5): 745-52.

Laud K, Marian C, Avril MF, et al. "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.

Lee KM, Kim DW, Heo DS. "Elevated TGF-beta1 secretion and downmodulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients". *Journal of Immunology.* 2004; 172(12): 7335-40.

Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, López-Botet M, et al. "HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A". *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* 1998; 95(9): 5199-204.

Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, et al. "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients". *Nature Medicine.* 1999; 5: 677-685.

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.

Lévêque L, Dalac S, Dompmartin A, Louvet S, Euvrard S, Catteau B, et al. "Melanoma in organ transplant patients". *Annales de Dermatologie et de Venereologie.* 2000; 127(2): 160-165.

Li K, Adibzadeh M, Halder T, Kalbacher H, Heinzl S, Müller C, et al. "Tumour-specific MHC-class-II-restricted responses after in vitro sensitization to synthetic peptides corresponding to gp100 and Annexin II eluted from melanoma cells". *Cancer Immunology Immunotherapy.* 1998; 47(1): 32-38.

Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. "NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules". *J Exp Med*. 1994; 180: 537-43.

Ljunggren HG, Karre K. "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition". *Immunol Today*. 1990; 11: 237-244.

Long EO. "Regulation of immune responses through inhibitory receptors". *Annual Review of Immunology*. 1999; 17: 875-904.

Long EO, Barber DF, Burshtyn DN, Faure M, Peterson M, Rajagopalan S, et al. "Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158)". *Immunological reviews*. 2001; 181: 223-33.

Long, EO. "Tumor cell recognition by natural killer cells". *Semin Cancer Biol*. 2002; 12 (1): 57-61.

López-Botet, M; Moretta, L; Strominger, J. "NK-cell receptor and recognition of MHC class I molecules". *Immunology today*. 1996; 17(5): 212-214.

López González JL, Molina Villaverde R, Martín Valadés JI, Álvarez de Mon Soto M. "Melanoma". *Medicine*. 2005; 9(27): 1764-71.

López-Hernández R, Valdés M, Lucas D, Campillo JA, Martínez-García P, Salama H, et al. "Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population". *Human Immunology*. 2010; 71(5): 512-4.

López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, Gonzalez S. "The NKG2D receptor: sensing stressed cells". *Trends Mol Med*. 2008; 14(4): 179-189.

Lucas D, Campillo JA, López-Hernández R, et al. "Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain". *Human Immunology*. 2008; 69(10): 655-60.

Luszczek W, Manczak M, Cislo M, et al. "Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris", *Human Immunology*. 2004; 65(7): 758-66.

Ma J, Guo X, Wu X, Li J, Zhu X, Li Z, et al. "Association of NKG2D genetic polymorphism with susceptibility to chronic hepatitis B in a Han Chinese population". *Journal of Medical Virology*. 2010; 82(9): 1501-7.

Maat W, Van der Slik AR, Verhoeven DH, Alizadeh DZ, Ly LV, Verduijn W, et al. "Evidence for Natural killer cell-mediated protection from metastasis formation in uveal melanoma patients". *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2009; 50(6): 2888–95.

Maddodi N, Setaluri V. "Role of UV in cutaneous melanoma". *Photochem Photobiol*. 2008; 84(2): 528-36.

Malarkannan S. "The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions". *Semin Immunol*. 2006; 18(3): 186-92.

Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. "Determinants of BRAF mutations in primary melanomas". *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 1878-90.

Mandelboim O, Reyburn HT, Valés-Gómez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, 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". *The journal of experimental medicine*. 1996; 184(3): 913-922.

Martayan A, Fraioli R, Giorda E, Setini A, Ciccarelli G, Delfino L, et al. "Biosynthesis of HLA-C heavy chains in melanoma cells with multiple defects in the expression of HLA-A, -B, -C molecules" *British Journal of Cancer*. 1999; 80 (5-6): 639–649.

Martin MP, Borecki IB, Zhang Z, Nguyen L, Ma D, Gao X, et al. "HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer". *Immunogenetics*. 2010; 62(11-12): 761–65.

Martin MP, Nelson G, Lee J-H, Pellett F, Gao X, Wade J, et al. 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.

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_21551-MELANOMA_WEB.pdf.

Martinovic KM, Konjevic G, Babovic N and Inic M. "The stage dependent changes in NK cell activity and the expression of activating and inhibitory NK cell receptors in melanoma patients". *The Journal of surgical research*. 2011; 171(2): 637-49.

Martin AM, Kulski JK, Witt C, Pontarotti P, Christiansen FT. "Leukocyte Ig-like receptor complex (LCR) in mice and men". *Trends in immunology*. 2002; 23(2): 81-88.

Matusali G, Kuekou Tchidjou H, Pontrelli G, Bernardi S, D'Ettorre G, Vullo V. "Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells" *The FASEB Journal*. 2013; 27: 2440-50.

McGregor S, Montgomery GW, Liu JZ, et al. "Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3". *Nature Genetics*. 2011; 43(11): 1114–18.

McQueen KL, Parham P. "Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells". *Current Opinion in Immunology*. 2002; 14(5): 615-21.

Melum E, Karlsen TH, Schrumpf E, Bergquist A, Thorsby E, Boberg KM, et al. "Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated with NKG2D polymorphisms". *Hepatology*. 2008; 47(1): 90-6.

Merino J, Martínez-González MA, Rubio M, Inogés S, Sánchez-Ibarrola A, Subirá ML. "Progressive decrease of CD8high+ CD28+ CD57- cells with ageing". *Clinical and experimental immunology*. 1998; 112(1): 48-51.

Metzelaar-Blok JA, Hurks HM, Naipal A, De Lange P, Keunen JE, Claas FH, et al. "Normal HLA class I, II, and MICA gene distribution in uveal melanoma". *Molecular Vision*. 2005; 11: 1166-72.

Middleton D, Gonzelez F. "The extensive polymorphism of KIR genes". *Immunology*. 2010; 129(1): 8–19.

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". *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996; 74(1): 43-7.

Mingari MC, Schiavetti F, Ponte M, Vitale C, Maggi E, Romagnani S, et al. "Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations". *Proceedings of the National Academy of USA*. 1996; 93(22): 12433-8.

Mingari MC, Ponte M, Cantoni C, Vitale C, Schiavetti F, Bertone S, et al. "HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells". *International immunology*. 1997; 9(4): 485-91.

Mingari MC, Moretta A, Moretta L. "Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses". *Immunology today*. 1998; 19(4): 153-7.

Mistry AR, O'Callaghan CA. "Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D". *Immunology*. 2007; 121(4): 439-47.

Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. "Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet's disease". *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 1997; 94(4): 1298-303.

Mizuki N, Meguro A, Tohnai I, Gül A, Ohno S, Mizuki N. "Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behçet's disease in Turkey". *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2007; 51(6): 431-6.

Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A. "Ultraviolet radiation and malignant melanoma". *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624: 104-16.

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". *Journal Immunology*. 2008; 180(69): 3969-79.

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". *Annual reviews of immunology*. 1996; 14: 619-48.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity". *Annual Reviews Immunology*. 2001; 19: 197–223.

Moretta L, Ciccone E, Pende D, Viale O, Di Donato C, Tripodi G, et al. "Existence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans". *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 1992; 26(2): 98-9.

Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. "Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors". *Advances in immunology*. 1994; 55: 341-80.

Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. "Surface NK receptors and their ligands on tumor cells". *Seminars in Immunology*. 2006; 18(3): 151-158.

Moretta A, Moretta L. "HLA class I specific inhibitory receptors". *Curr Opin Immunol*. 1997; 9(5): 694-701.

Moretta L., Moretta A. "Killer immunoglobulin-like receptors". *Curr Opin Immunol*. 2004; 16: 626-633.

Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. "Existence of both inhibitory (p58) and activating (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells". *J Exp Med*. 1995; 182: 875–84.

Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. "A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function". *J Exp Med*. 1990; 171: 695–714.

Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, et al. "P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities". *J Exp Med*. 1993; 178: 597–604.

Morgado S, Sanchez-Correa B, Casado JG, Duran E, Gayoso I, Labella F, et al. "NK Cell Recognition and Killing of Melanoma Cells Is Controlled by Multiple Activating Receptor-Ligand Interactions". *Journal of Innate Immunity*. 2011; 3(4) : 365-373.

Muñoz-Saá I, Cambra A, Pallarés L, et al. "Allelic diversity and affinity variants of MICA are imbalanced in Spanish patients with Behçet's disease". *Scandinavian Journal of Immunology*. 2006; 64(1): 77-82.

Nasca R. and Carbone E. "Natural killer cells as potential tools in melanoma metastatic spread control". *Oncology Research*. 1999; 11(8): 339-343.

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.

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 Immunology Immunotherapy*. 2005; 54(2): 172–78.

Naumova E, Mihaylova A, Milena I, Mihailova S. "Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma". *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2007; 56(1): 95–100.

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". *Journal of immunology*. 2004; 173(7): 4273-6.

Nickoloff BJ. "Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe?". *The Journal of clinical investigation*. 1999; 104(9): 1161-4.

Niepiekło-Miniewska W, Majorczyk E, Matusiak L, Gendzekhadze K, Nowak I, Narbutt J, et al. Protective effect of the KIR2DS1 gene in atopic dermatitis. *Gene*. 2013; 527:594–600.

Norris S, Kondeatis E, Collins R, et al. "Mapping MHC-encoded susceptibility and resistance in primary sclerosing cholangitis: the role of MICA polymorphism". *Gastroenterology*. 2001; 120(6): 1475-482.

Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, et al. "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.

O'Callaghan CA. "Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leucocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumour cells". *Clinical Science*. 2000; 99(1): 9–17.

O'Callaghan CA. "Natural killer cell surveillance of intracellular antigen processing pathways mediated by recognition of HLA-E and Qa-1b by CD94/NKG2 receptors". *Microbes and Infection*. 2000; 2(4): 371–80.

Orange JS. "Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse". *Nat Rev Immunol*. 2008; 8 (9): 713-25.

Ozturk OG, Gun FD, Polat G. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. *Med Oncol*. 2012; 29:511–5.

Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelme E, Brazzelli V, et al. "Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan-A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo". *Journal of Investigative Dermatology*. 2001; 117(2): 326–32.

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.

Parham P. "Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors". *Tissue antigens*. 2003; 62(3): 194-200.

Parham P. "NK cells lose their inhibition". *Science*. 2004; 305(5685): 786-7.

Parham P. "MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival". *Nature reviews Immunology*. 2005; 5(3): 201-14.

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.

Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Duc Nguyen X, et al. "Differential Clinical Significance of Individual NKG2D Ligands in Melanoma: Soluble ULBP2 as an Indicator of Poor Prognosis Superior to S100B". *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(16): 5208-15.

Pende D, Accame L, Pareti L, Mazzocchi A, Moretta A, Parmiani G, et al. "The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class-I positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles". *European Journal of Immunology*. 1998; 28(8): 2384–2394.

Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, et al. "Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin". *European Journal of Immunology*. 2001; 31(4): 1076-86.

Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. "Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity". *Blood*. 2009; 113(13): 3119–29.

Petersdorf EW , Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. "Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene". *Immunogenetics*, 1999; 49(7-8): 605-12.

Piontek GE, Taniguchi K, Ljunggren HG, Grönberg A, Kiessling R, Klein G, et al. "YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage". *J Immunol*. 1985; 135: 4281–8.

Piotrowski P, Lianeri M, Olesinska M, Jagodzinski PP. "Prevalence of the NKG2D Thr72Ala Polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus". *Molecular Biology Reports*. 2012; 39(2): 1343-7.

Pittari G, Liu XR, Selvakumar A, et al. "NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand". *Journal of Immunology*. 2013; 190(9): 4650-60.

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". *Journal of immunology*. 2000; 164(3): 1148-52.

Rajagopalan S, Long EO. "Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease". *The Journal of experimental medicine*. 2005; 201(7): 1025-9.

Rajalingam R. "Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease" *The Korean journal of hematology*. 2011; 46(4): 216-28.

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.

Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. "Regulation of the natural killer cell receptor repertoire". *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 291-330.

Raulet DH. "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands". *Nature Reviews immunology*. 2003; 3(10): 781-90.

Raulet DH. "Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells". *Semin Immunol*. 2006; 18 (3): 145-50.

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.

Rigel RS, Friedman RJ, and Kopf AW “The incidence of malignant melanoma in the united states: Issue as we approach the 21st century”, *Journal of American Academy of Dermatology*. 1996; 34: 839-47.

Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A and Herrmann T. “Activation of V γ 9V δ 2 T Cells by NKG2D” *The Journal of Immunology*. 2005; 175(4): 2144-51.

Robertson MJ, Ritz J. “Biology and clinical relevance of human natural killer cells”. *Blood*. 1990; 76(12): 2421-38.

Robertson MJ, Ritz J. “Biology and clinical relevance of human natural killer cells”. *Blood* 1990; 76: 2421–38.

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”. *Journal of immunology*. 2005; 175(12): 7796-9.

Rozzak A, Lianeri M, Jagodziński PP. “Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma”. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2012; 16(8): 841-5.

Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. “Cutting edge: downregulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding”. *Journal of Immunology*. 2002; 169: 4098–102.

Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. "Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients". *Human Immunology*. 2006; 67(3): 188–95.

Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H, Piatak M, Vernikos GS, Coggill P, et al. "Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates". *BMC Genomics*. 2006; 15(7): 209.

Shen Y, Lu C, Tian W, Wang L, Cui B, Jiao Y, et al. "Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer". *International journal of oncology*. 2012; 40(4): 1285-1290.

Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. "Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression". *Cell Immunology*. 2006; 239(1): 22–30.

Speiser DE, Pittet MJ, Valmori D, Dunbar R, Rimoldi D, Liénard D, et al. "In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes". *The journal of experimental medicine*. 1999; 190(6): 775-82.

Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. "Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family". *Immunogenetics*. 2001; 53(4): 279-87.

Stewart C.A, Laugier-Anfossi F, Vely F, et al. "Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors". *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 2005; 102(37): 13224-13229.

Strohal R, Marberger K, Pehamberger H, Stingl G. "Immunohistological analysis of anti-melanoma host responses". *Archives of dermatological research*. 1994; 287(1): 28-35.

Sun JC. "Re-educating natural killer cells". *J Exp Med*. 2010; 207 (10): 2049-52.
Susan E. Hiby, Mary Carrington, Ashley Moffett. "Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2". *J Clin Invest*. 2010;120 (11):4102-4110.

Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, et al. "Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris". *Journal of Investigative Dermatology*. 2004; 122(5): 1133-1136.

Swetter SM. Malignant Melanoma. 2010. <http://emedicine.medscape.com/article/1100753-overview>.

Sze DM, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, et al. "Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8(+)CD57(+)CD28(-) compartment". *Blood*. 2001; 98(9): 2817-27.

Tajik N, Shahsavari F, Poormoghimi H, Radjabzadeh MF, Mousavi T, Jalali A "KIR3DL1+HLA-B Bw4Ile80 and KIR2DS1+ HLA-C2 combinations are both associated with ankylosing spondylitis in the Iranian population". *International Journal of Immunogenetics*. 2011; 38(5): 403–09.

Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, Nicol A, Porcelli SA, Ishikawa Y, et al. "Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells". *Journal of immunology*. 2000; 164(9): 4458-64.

Tamaki S, Sanefuzi N, Kawakami M, Aoki K, Imai Y, Yamanaka Y et al. "Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients" *Human Immunology*. 2008; 69(2): 88–93.

Tarazona R, Casado JG, Delarosa O, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Sanchez B. "Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals". *Journal of clinical immunology*. 2002; 22(3): 176-83.

Terabe M, Berzofsky JA. "The role of NKT cells in tumor immunity". *Adv Cancer Res*. 2008; 101: 277-348.

Thielens A, Vivier E, Romagné F. "NK cells MHC class I specific receptors (KIR) from biology to clinical intervention". *Current Opinion Immunology*. 2012; 24(2): 239–45.

Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, et al. "Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database". *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29(16): 2199.

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.

Topalian SL. "MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy". *Current opinion in immunology*. 1994; 6(5): 741-5.

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". *European journal of immunology*. 1998; 28(12): 3959-67.

Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J. "Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades". *Revista instituto nacional del enfermedades respiratorias de México*. 2008; 21(1): 57-65.

Trinchieri G, Santoli D, Dee RR, Knowles BB. "Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation". *J Exp Med*. 1978; 147: 1299–313.

Trinchieri G et al. "The choices of a natural killer". *Nature immunology*. 2003; 4:509-510.

Upshaw JL, Leibson PJ. "NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes unique signalling pathways and distinct functional outcomes". *Seminars in Immunology*. 2006; 18(3): 167-75.

Valés-Gómez M, Reyburn HT, Mandelboim M, Strominger JL. "Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors". *Immunity*. 1998; 9(3): 337-44.

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.

Vallian S, Rad MJ, Tavallaei M, Tavassoli M. "Correlation of major histocompatibility complex class I related A (MICA) polymorphism with the risk of developing breast cancer". *Medical Oncology*. 2012; 29(1): 5-9.

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.

Van Oijen M, Bins A, Elias S, Sein J, Weder P, de Gast G, et al. "On the Role of Melanoma-Specific CD8⁺ T-Cell Immunity in Disease Progression of Advanced-Stage Melanoma Patients". *Clinical Cancer Research*. 2004; 10(14): 4754-60.

Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. "HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1". *New England Journal of Medicine*. 2012; 367: 805–816.

Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. "A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation". *Leukemia*. 2005; 19(8): 1446-51.

Vetter CS, Straten PT, Terheyden P, Zeuthen J, Bricker EB, Becker JC. "Expression of CD94/NKG2 subtypes on tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic melanoma". *The Journal of investigative dermatology*. 2000; 114(5): 941-7.

Vetter CS, Groh V, Straten Pt, Spies T, Bröcker EB, Becker JC. "Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma". *Journal of Investigative Dermatology*. 2002; 118(4): 600-5.

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).

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-Like domains”. *J Immunol*. 2000; 164: 5797-5804 (b).

Vilches C. , Parham P. “KIR: diverse rapidly evolving receptors of innate and adaptative immunity”. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 217-251.

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”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1995; 92(8): 3536-40.

Vivier E, Nunís JA, Vély F. “Natural killer cell signaling pathways”. *Science*. 2004; 306(5701): 1517-9.

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.

Waldhauer I, Steinle A. “Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells”. *Cancer Research*. 2006; 66(5): 2520–6.

Waldhauer I, Steinle A. “NK cells and cancer immunosurveillance”. *Oncogene*. 2008; 27 (45): 5932-43.

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.

Warycha MA, Christos PJ, Mazumdar M, Darvishian F, Shapiro RL, Berman RS, et al. “Changes in the presentation of nodular and superficial spreading melanomas over 35 years”. *Cancer*. 2008; 113(12): 3341–3348.

Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics*. 2010; 62:767–71.

Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Hicks R, Sissons JG, Carmichael AJ. “Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57+ CD28- CD8+ T-cell population”. *Immunology*. 1999; 98(3): 443-9.

Wei-juan Gong, Wei-ming Xiao, Chun-xiang Gong, Fang Tian, Ming-chun Ji “Association of MICA gene polymorphism and serum soluble MICA level with colorectal cancer”. *Chinese journal of medical genetics*. 2010; 27(3): 335-9.

Williams F, Meenagh A, Sleator C, et al. “Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis”. *Human Immunology*. 2005; 66(7): 836-841.

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.

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.

Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10". *Science*. 1999; 285(5428): 730-2.

Wu J, Lanier LL. "Natural killer cells and cancer". *Advances in Cancer Research*. 2003; 90: 127-56.

Yamada I, Seki S, Ito S, Suzuki S, Matsubara O, Kasuga T. "The effect of L-dopa on the potentiation of radiation damage to human melanoma cells". *Br J Cancer*. 1990; 62(1): 33-6.

Yokoyama WM, Kim S. "How do natural killer cells find self to achieve tolerance?". *Immunity*. 2006; 24 (3): 249-57.

Yokoyama WM, Plougastel BF. "Immune functions encoded by the natural killer gene complex". *Nat Rev Immunol*. 2003; 3 (4): 304-16.

Young P, Jackman L, Mooloy D, Green A. "A study of infertility treatment and melanoma". *Melanoma Res*. 2001; 11(5): 535-41.

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". *Cellular immunology*. 1996; 173(2): 287-94.

Zhang C, Zhang J, Sun R, Feng J, Wei H, and Tian Z. "Opposing effect of IFN gamma and IFN gamma on expression of NKG2 receptors: negative regulation of IFN gamma on NK cells". *International journal of Immunopharmacology*. 2005; 5(6): 1057-1067.

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". *J Exp Med*. 2012; 226(1): 59-68.

Zwirner NW, Fernandez-Viña MA, Stastny P. "MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes". *Immunogenetics*. 1998; 47(2): 139-48.