

DEPARTAMENTO DE MEDICINA.

ESTUDIO DEL FENOTIPO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES EN SANGRE PERIFÉRICA DE
PACIENTES CON MELANOMA. ANÁLISIS DE LOS
NIVELES SÉRICOS Y POLIMORFISMO DE CITOQUINAS.

JORGE ANTONIO MARTÍNEZ ESCRIBANO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de Octubre de 2001 davant un tribunal format per:

- Pablo Unamuno Pérez
- Victor Alegre de Miguel
- José Manuel Martín Villa
- Javier Bravo Piris
- Esperanza Jordá Cuevas

Va ser dirigida per:

Prof. Dr J.M.Fortea Baixauli, M.R.Álvarez López y T.Hernández Caselles

©Copyright: Servei de Publicacions
Jorge Antonio Martínez Escribano

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5570-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

A:	adenina
AcMo:	anticuerpos monoclonales
Ag:	antígeno
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
APCs:	células presentadoras de antígeno
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
BcR:	receptor de célula B
C:	citosa
CD40L:	ligando de CD40
CD95L:	ligando de CD95
sCD95L	forma soluble del CD95L
CTLs:	linfocitos T citotóxicos
CV:	coeficiente de variación
DCs:	células dendríticas
ELISA:	enzimoinmunoanálisis
FasL:	ligando de Fas
Fc:	fracción constante
FITC:	isotiocianato
G:	guanina
HLA:	antígeno leucocitario humano
Ig:	inmunoglobulina
IFM:	intensidad media de fluorescencia
IFN:	interferón
IL:	interleuquina
IL-R:	receptor de IL
KAR:	receptor de activación de células NK
KIR:	receptor de inhibición de células NK
LMM:	léntigo maligno melanoma
NM	no metástasis
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
MES:	melanoma de extensión superficial
MLA:	melanoma lentiginoso acral
MN:	melanoma nodular

MR	metástasis regionales
MV	metástasis viscerales
NK:	“asesina” natural (<i>natural killer</i>)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	solución salina tamponada
PCR:	reacción de la polimerasa en cadena
PE:	ficoeritrina
PerCP:	proteína clorofila peridinina
T:	timina
TcR:	receptor de célula T
TGF:	factor de crecimiento tumoral
Th:	T colaboradores
TNF:	factor de necrosis tumoral
UV:	ultravioleta
VEGF:	factor de crecimiento endotelial vascular

I. ANTECEDENTES

La incidencia de cáncer cutáneo ha aumentado de modo progresivo hasta el momento actual y, en general, se espera que lo seguirá haciendo en el futuro, debido a la naturaleza acumulativa de factores inductores de fotocarcinogénesis, como la radiación ultravioleta (UV), unido al incremento en las expectativas de vida y, probablemente, el descenso en la capa de ozono (*Kelfkens y cols, 1990*). La forma más grave de cáncer cutáneo es el melanoma, tumor maligno derivado de los melanocitos. Hoy en día, el melanoma se considera como un problema de salud pública en numerosos países (*Marks, 2000*).

Con los conocimientos actuales de la Medicina, el curso evolutivo del melanoma resulta con frecuencia imprevisible, es decir, hay pacientes que evolucionan mejor de lo previsto y otros cuya enfermedad progresa de un modo más agresivo al esperado. El sistema inmunitario del individuo puede jugar un papel importante en esta, aparentemente caprichosa, evolución del tumor (*Ackerman, 2000*). En los últimos años se han realizado múltiples trabajos encaminados a conocer mejor el mecanismo de acción y los efectos de los distintos componentes del sistema inmunitario en su defensa frente a los tumores en general, y al melanoma en particular (*Nestle y cols, 1999*). Además, en la actualidad existe una presión creciente para comprobar si los conceptos inmunológicos desarrollados *in vitro* y en modelos de experimentación animal también son aplicables a los humanos y trasladables a un contexto terapéutico beneficioso para el paciente.

1. EPIDEMIOLOGÍA

Aunque el melanoma sólo representa el 3% de las neoplasias malignas cutáneas, provoca el 65% de las muertes por cáncer de piel y el 1,3% del total de fallecimientos por cáncer en general (*Weinstock y Boyle, 1998*).

La incidencia mundial de melanoma ha aumentado espectacularmente durante los últimos decenios. La tasa de incremento anual en la incidencia de

melanoma varía según las distintas poblaciones de individuos, pero se considera que ha sido del 3-7% para la población caucasiana (*Armstrong y Kricker, 1994*). Afortunadamente, en los últimos años se ha producido una estabilización en la incidencia de dicho tumor en Australia y el norte de Europa, tendencia que es más pronunciada en gente joven y en mujeres, quizás debido a las campañas públicas de educación para concienciar a la población sobre los factores de riesgo. No obstante, la incidencia de melanoma ha aumentado más que la de ningún otro cáncer en Estados Unidos, con un incremento desde los 5,7 casos por 100.000 habitantes y año en 1973 hasta los 12,5 en 1994, lo cual supone un incremento medio anual del 3,6% (*Dennis, 1999*). En este último país, el riesgo de desarrollar un melanoma ha crecido desde 1:1.500 individuos en 1935 hasta 1:135 en 1987, y algunos estudios predicen que uno de cada 75 sujetos nacidos en el año 2000 desarrollará un melanoma a lo largo de su vida (*Rigel y cols, 1996*).

Existen discrepancias sobre si el aumento en la incidencia de melanoma es el resultado de un incremento en la vigilancia y/o un verdadero cambio relacionado con la mayor exposición a agentes nocivos como la radiación solar u otros factores carcinogénicos ambientales. Algunos autores han descrito que ni la tasa de mortalidad por melanoma ni la incidencia de melanomas en estadio avanzado ha disminuído, lo cual implicaría que el incremento en la incidencia es real y no sólo provocado por una mejor vigilancia epidemiológica y detección precoz del tumor (*Swerlick y Chen, 1997*). Dennis describió un incremento anual en la incidencia de melanoma entre 1988 y 1994 del 3,3% para tumores de menos de 1 mm. de espesor, del 3,9% para los de espesor intermedio (1,00-2,99 mm.) y del 4,6% para los de mayor espesor (3,00 mm. o más) (*Dennis, 1999*). Esto es importante, pues las tasas de supervivencia son más bajas para los melanomas de mayor espesor (73% a los 2 años y 48% a los 5 años) que para todos los melanomas considerados en su conjunto (88% y 75% respectivamente) (*Dennis, 1999*). Quizás por ello, los índices de mortalidad por melanoma también han crecido en los últimos años, aunque de forma mucho más lenta que las tasas de incidencia. Entre 1973 y 1994, la mortalidad por melanoma creció desde 1,6 hasta 2,2 casos por 100.000 habitantes y año (*Dennis, 1999*). Simultáneamente a estos incrementos en la incidencia y mortalidad también se ha registrado un aumento en los índices de supervivencia. La supervivencia a los 5 años de los enfermos con

melanoma era del 40% en 1940, 68% en 1970 y 81% en 1985 (*Silvenberg y cols, 1990*). Desafortunadamente, en España todavía no disponemos de datos fidedignos y actualizados sobre la incidencia y mortalidad por melanoma, y la mayoría de los datos disponibles proceden de estudios parciales y de cálculos indirectos (*Ginarte y Toribio, 2000*).

En general, la incidencia de melanoma es igual en ambos sexos. Sí existen diferencias, según el sexo, en cuanto a la localización anatómica del tumor primario para los tipos histológicos más comunes de melanoma, con un predominio de las lesiones localizadas en las piernas en la mujer y en la espalda en el hombre (*Crombie, 1981*). No obstante, cada vez hay más melanomas que afectan a la espalda de las mujeres, lo que se ha atribuido a cambios de comportamiento social (*Hall y cols, 1999*).

Aunque el melanoma puede aparecer en cualquier edad y cada vez se diagnostica más en individuos jóvenes, la mayor frecuencia se produce en las décadas medias de la vida (*Álvarez-Mon y cols, 1997*).

2. ETIOLOGÍA DEL MELANOMA Y FACTORES PREDISPONENTES

En la etiología del melanoma han sido implicados tanto factores genéticos, o intrínsecos al individuo, como extrínsecos o ambientales. En algunos casos, más que de factores etiológicos, sería más correcto hablar de factores predisponentes.

2.1. Factores intrínsecos

2.1.1. Fototipo

El fototipo cutáneo se define por la forma de reaccionar la piel ante la exposición solar. Existe mayor riesgo de desarrollar melanoma en individuos con tendencia al eritema rápido tras la exposición solar aguda y con escasa tendencia al bronceado tras la exposición crónica (fototipos I y II) (*Ródenas y cols, 1996*).

2.1.2. Nevus melanocíticos

El melanoma cutáneo ocurre con más frecuencia en individuos con mayor número de nevos en la zona donde se origina dicho tumor (*Ródenas y cols, 1997*). Por tanto, un gran número de nevos se considera un marcador de riesgo para desarrollar melanoma cutáneo. El número de nevos, al igual que la presencia de efélides, puede ser un indicador de la sensibilidad de la piel al sol y de la cantidad de exposición solar recibida.

Los nevos displásicos se consideran tanto marcadores de riesgo como precursores potenciales de melanoma. Estos nevos tienen una baja prevalencia en individuos sin melanoma, mientras que al menos el 17% de los pacientes con melanoma, sin antecedentes familiares de dicho tumor, presentan uno o más nevos displásicos (*Rhodes, 1999*).

Clásicamente se consideraba que los nevos congénitos eran el principal factor de riesgo para el desarrollo de melanoma en la infancia. Estudios recientes indican que, como ocurre en el adulto, los nevos melanocíticos adquiridos y las efélides son los marcadores de riesgo para desarrollar un melanoma más importantes, también en la edad infantil (*Whiteman y cols, 1997*).

2.1.3. Factores hormonales

Se ha discutido mucho sobre la influencia de las hormonas, endógenas o exógenas, en la patogenia del melanoma. De hecho, se han publicado resultados contradictorios sobre la relación entre la ingesta de anticonceptivos hormonales y la aparición de melanoma (*Jatoi y Gore, 1993; Travers y cols, 1995*).

En 1976, se describió por primera vez la existencia de receptores estrogénicos en el melanoma (*Fisher y cols, 1976*). No obstante, no siempre se detectan dichos receptores (*Lecavalier y cols, 1990*) y actualmente se desconoce el significado de su presencia, no habiéndose podido relacionar con el pronóstico (*Cohen y cols, 1990*). Aunque algunos autores han observado que los melanomas diagnosticados durante el embarazo tienen una evolución clínica más agresiva, este hecho no ha sido corroborado en la mayoría de los estudios. Es posible que la mala evolución observada en algunos casos coincida con el pequeño

porcentaje de melanomas que presentan receptores estrogénicos (*Slingluff y cols, 1990*).

2.1.4. Factores inmunológicos

De modo análogo a como ocurre con otros cánceres de piel, se ha relacionado un estado inmunitario deficiente con un incremento en la incidencia de melanoma. En este sentido, en pacientes transplantados con inmunosupresión terapéutica se ha demostrado un aumento de 2 a 5 veces en la tasa de incidencia de melanoma (*Euvrard y cols, 1997; Leveque y cols, 2000*). No obstante, no todos los estudios han confirmado el aumento en la incidencia de cáncer de piel tipo melanoma en pacientes transplantados (*Lindelof y cols, 2000*).

2.2. Factores extrínsecos

2.2.1. Exposición a la luz solar

Múltiples estudios epidemiológicos apoyan la importancia de la luz solar como principal factor de riesgo para el desarrollo de melanoma. El melanoma se asocia más con quemaduras de la piel tras exposiciones agudas al sol, especialmente las ocurridas durante la infancia, que con la exposición crónica al mismo (*Zanetti y cols, 1992*). No obstante, la frecuente localización del melanoma en áreas no fotoexpuestas plantea la posibilidad de que pueden existir otros factores etiológicos adicionales.

Los queratinocitos entran fácilmente en apoptosis después de la exposición a dosis elevadas de luz UV. Por el contrario, los melanocitos están "protegidos" de la apoptosis inducida por la radiación UV mediante la expresión de niveles elevados de la oncoproteína Bcl2, de modo que tras la exposición a la luz UV se acumulan dímeros de timidina, los cuales estimulan tanto la capacidad de reparación del ADN como la melanogénesis. Los puntos más susceptibles para las mutaciones inducidas por luz UV durante la transformación maligna del melanocito se encuentran en los cromosomas 1p, 9p, 6q y 11q. Estas mutaciones son contrarrestadas por los mecanismos de reparación del ADN inducidos por la

propia luz UV. Esto explicaría por qué las exposiciones agudas e intermitentes a altas dosis de luz UV acarrearán el mayor riesgo de desarrollo de melanoma, pues en estos casos no hay tiempo suficiente para activar los mecanismos de reparación del ADN del melanocito, con lo cual los daños en dicho material genético se van acumulando favoreciendo la transformación maligna (*Nestle y cols, 1999*).

Además, la radiación UV inhibe la capacidad de las células de Langerhans para presentar el antígeno tumoral, tanto por citotoxicidad directa como, indirectamente, a través de la liberación por parte de los queratinocitos de citoquinas inhibitorias (*Ullrich, 1995*). De este modo, la luz UV inhibe el primer eslabón en la cadena de vigilancia inmunológica de la epidermis. Adicionalmente, los rayos UV tienen capacidad de destruir los linfocitos que acuden a la piel.

Noz y cols. analizaron la susceptibilidad al daño celular inducido por radiación UVB sobre nevus displásicos, nevus melanocíticos intradérmicos y nevus localizados en prepucio. Antes del experimento, dichos autores observaron que los nevus displásicos mostraban ya un daño en el ADN superior a los otros dos grupos. Y tras la exposición a la luz UVB, se indujo el doble de daño en el ADN de los nevus displásicos que en el de los nevus melanocíticos intradérmicos, es decir, los primeros eran más susceptibles a dicha luz. Tras practicar controles con radiación ionizante (rayos X), no encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de nevus, lo cual apoyaba el papel de la radiación UVB en la alteración de los nevus displásicos (*Noz y cols, 1996*).

También se ha observado que tras la exposición a radiación UVB de cultivos de células de melanoma, disminuye la expresión de cadherinas E y P, moléculas responsables de mantener la integridad epidérmica y de las interacciones melanocito-queratinocito, postulándose su posible papel en la progresión tumoral (*Seline y cols, 1996*).

2.2.2. Fuentes artificiales de luz UV

Aunque no existe unanimidad al respecto, resulta lógico y cada vez son más los estudios que demuestran que el empleo de lámparas bronceadoras incrementa el riesgo de padecer un melanoma (*Chen y cols, 1998*). Parece ser

que no hay evidencia suficiente de que los tubos de luz fluorescente puedan favorecer la aparición de melanoma (*Ródenas, 1999*).

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DEL MELANOMA

La presentación clínica del melanoma cutáneo es muy variable, aunque suele manifestarse como una lesión hiperpigmentada, polícroma, asimétrica y de bordes irregulares. Según su presentación clínica y características histológicas podemos distinguir cuatro tipos de melanoma cutáneo primario:

3.1. Léntigo maligno melanoma (LMM)

Representa entre un 4% y un 15% del total de melanomas (*Langley y cols, 1999*). Aparece sobre todo en la piel fotoexpuesta de cabeza y cuello, en personas mayores de 60 años. Comienza como una mácula hiperpigmentada que crece lentamente y de forma no homogénea durante años. Las áreas de regresión tumoral, características de esta variedad de melanoma, se manifiestan clínicamente como zonas grisáceas o con tonos más claros.

Histopatológicamente, el LMM se caracteriza por una proliferación de melanocitos atípicos distribuidos a lo largo de la capa basal epidérmica, intercalados entre los queratinocitos y agrupándose formando nidos. La masa tumoral se extiende lateralmente de modo que los melanocitos atípicos van reduciéndose paulatinamente hasta confundirse con un incremento del número de melanocitos normales. Pueden afectarse los folículos y glándulas sudoríparas, lo cual puede dar lugar a recidivas si se aplican tratamientos demasiado superficiales. Suelen encontrarse cambios característicos de piel fotoexpuesta, como atrofia epidérmica, elastosis e incontinencia pigmentaria.

3.2. Melanoma de extensión superficial (MES)

Es la variante más frecuente (40-70%) (*Langley y cols, 1999*), y su localización más habitual es la espalda en los hombres y las piernas en las

mujeres. Afecta sobre todo a adultos jóvenes, entre la cuarta y quinta décadas de la vida. Clínicamente se manifiesta como una lesión pigmentada, de color variable y borde irregular.

El estudio histopatológico demuestra una proliferación de melanocitos atípicos, distribuidos de forma aislada o formando nidos a lo largo de toda la epidermis, que atraviesan la membrana basal.

3.3. Melanoma nodular (MN)

Es la segunda forma más frecuente de melanoma (15-30%) (*Langley y cols, 1999*). Al igual que el MES, puede aparecer en cualquier lugar de la superficie corporal, con predilección por el tronco en los hombres y los miembros inferiores en las mujeres, y afecta sobre todo a adultos en la quinta década de la vida. Comienza como un nódulo tumoral desde la fase más inicial en que es reconocible, el cual crece con rapidez, pues muestra desde su inicio una gran capacidad de invasión dérmica. En menos del 5% de los casos esacrómico, aunque suele haber áreas de tonalidad azul-grisácea dentro de la lesión.

El examen anatomopatológico demuestra un nódulo de células cuboideas o fusiformes, desarrollado a partir de la unión dermo-epidérmica. La epidermis suprayacente está adelgazada y la lateral no muestra melanocitos atípicos. La epidermis sólo se afecta cuando existe invasión por algún grupo de melanocitos de la masa tumoral subyacente. Los bordes del tumor están bien definidos, con un collarete de hiperplasia epidérmica que lo delimita. La ulceración es un hallazgo frecuente.

3.4. Melanoma lentiginoso acral (MLA)

En la población caucasiana, el MLA es la forma más infrecuente de melanoma (2-8%) (*Langley y cols, 1999*). Afecta sobre todo a individuos en la sexta y séptima década de la vida. Se localiza en palmas, plantas, y regiones interdigitales y distales de los dedos, aunque un pequeño número lo hace en las áreas sin pelo de las muñecas y tobillos. No todas las lesiones situadas en estas localizaciones corresponden a este tipo de melanoma; en algunas series sólo el

68% son MLA y el resto corresponden a MN o MES. Dentro del MLA existe una variante clínica muy característica, que corresponde al melanoma subungueal con pigmentación de la matriz y la piel periungueal, lo cual es clave para su diagnóstico (signo de Hutchinson).

En las etapas iniciales, cuando el MLA se manifiesta clínicamente como una mácula hiperpigmentada, el estudio histopatológico demuestra una hiperplasia de melanocitos atípicos con núcleos grandes, hiper cromáticos y pleomórficos. En esta fase, el MLA presenta un patrón lentiginoso similar al LMM, pero sus células muestran una mayor capacidad invasiva y epidermotropismo. Cuando las lesiones son papulonodulares, los melanocitos se extienden e invaden la dermis. Aunque el MLA comparte numerosas características histológicas con el LMM, a diferencia de éste, no suele existir atrofia epidérmica ni elastosis, sino que la epidermis es acantósica, como corresponde a las zonas donde se localiza, con elongación de las crestas interpapilares.

4. FASES DE CRECIMIENTO DEL MELANOMA CUTÁNEO PRIMARIO

El melanoma cutáneo primario avanza en dos fases en su proceso expansivo: fase de crecimiento radial u horizontal y fase de crecimiento vertical. La fase de crecimiento radial es una etapa biológica en la que las células tumorales progresan de forma centrífuga, avanzando tanto hacia el estrato córneo como hacia el interior. Las células que crecen hacia el exterior son eliminadas con las escamas del estrato córneo, mientras que las de la base del tumor pueden ser destruidas en su mayor parte por la respuesta inmunitaria del huésped, siempre que ésta sea eficiente. Las células intraepidérmicas que invaden el estrato espinoso y basal son las que tienen más facilidad para subsistir y adquirir autonomía de proliferación. Clínicamente, esta fase se traduce en un lento aumento del diámetro de la lesión. La duración de la fase de crecimiento horizontal es muy variable. Según Clark y cols., el paso o transición de la fase de crecimiento radial a la de crecimiento vertical resulta crítico, y es entonces cuando el melanoma adquiere capacidad metastásica (*Clark y cols, 1984*).

5. PRONÓSTICO

Hasta el momento, los factores pronósticos más estudiados en pacientes con melanoma han sido clínicos y, sobre todo, histológicos. A continuación se detallan algunos de ellos.

5.1. Factores pronósticos clínicos

5.1.1. Estadio clínico

Para el estadiaje del melanoma cutáneo se han empleado básicamente dos sistemas de clasificación. El de la Organización Mundial de la Salud (OMS), prácticamente en desuso, agrupa a los pacientes en tres estadios según la extensión de la enfermedad sea local, regional o diseminada (estadios I, II y III respectivamente). La clasificación más empleada es la del AJCC (American Joint Committee on Cancer), equivalente a la TNM (*primary tumor, regional lymph node metastasis, remote metastasis*). Recientemente, los principales rasgos clínicos y patológicos del melanoma que predicen el riesgo de metástasis y la supervivencia han sido revisados por dicho Comité, el cual ha propuesto un nuevo sistema de clasificación de los enfermos afectados de melanoma (*Balch y cols, 2000*) (tabla I). Dicho sistema considera el espesor de Breslow y la ulceración a nivel histológico como los principales criterios para definir la clasificación T (según el tamaño del tumor). Además, en la clasificación N (afectación ganglionar), se diferencia según el número de ganglios linfáticos infiltrados por el tumor, valorando si se trata de micro o macrometástasis y si aparecen metástasis en tránsito o lesiones satélites. Y en la clasificación M (aparición de metástasis), se separan las metástasis a distancia en piel, tejido celular subcutáneo o ganglios linfáticos de las metástasis viscerales, las cuales tienen peor pronóstico, y se concede a las metástasis pulmonares un pronóstico intermedio entre ambas. Teniendo en cuenta todo lo anterior, los enfermos con melanoma se pueden agrupar en distintos estadios, de modo que los estadios I y II engloban a los sujetos con melanomas cutáneos primarios localizados, el III a los que presentan metástasis regionales, y el IV a los que ya han desarrollado metástasis a distancia.

TABLA I. Clasificación TNM según el Comité de Estadaje de Melanoma de la AJCC (Balch y cols, 2000).

Clasificación T	Clasificación N	Clasificación M
<p>T1 $\leq 1,00$ mm a: no ulceración b: ulceración o nivel IV /V de Clark</p>	<p>N1 1 ganglio a: micrometástasis ^x b: macrometástasis ^y</p>	<p>M1 Metástasis a distancia en piel, tejido celular subcutáneo o ganglios linfáticos, con LDH normal</p>
<p>T2 1,01-2,00 mm a: no ulceración b: ulceración</p>	<p>N2 2-3 ganglios a: micrometástasis ^x b: macrometástasis ^y c: metástasis en tránsito o satelitosis ^z sin ganglios</p>	<p>M2 Metástasis en pulmón con LDH normal</p>
<p>T3 2,01-4,00 mm a: no ulceración b: ulceración</p>	<p>N3 ≥ 4 ganglios, o combinaciones de ganglio(s) linfático(s) metastásico(s) y metástasis en tránsito/satelitosis o melanoma ulcerado.</p>	<p>M3 Metástasis viscerales (excepto pulmón) con LDH normal, o cualquier metástasis a distancia con LDH elevada)</p>
<p>T4 $> 4,00$ mm a: no ulceración b: ulceración</p>		

^x Las micrometástasis son diagnosticadas tras la linfadenectomía electiva o selectiva (ganglio centinela).

^y Las macrometástasis se detectan clínicamente y se confirman por linfadenectomía terapéutica; incluyen ganglios metastásicos con gran afectación extracapsular.

^z Las satelitosis son los nidos de células tumorales de más de 0,05 mm de diámetro situados a menos de 2 cm del cuerpo principal del tumor y separados del mismo por colágeno dérmico o tejido celular subcutáneo normal. Las metástasis en tránsito son las que afectan a la piel o tejido celular subcutáneo más allá de 2 cm del tumor primario pero no más allá de los ganglios linfáticos regionales.

Como ya se ha visto, el estadio clínico se determina mediante la conjunción de factores clínicos e histológicos, y cuanto más avanzado, peor es el pronóstico. Dentro de cada estadio, los factores que determinan el pronóstico varían. Cuando la enfermedad es localizada, la variable independiente con mayor valor pronóstico es el espesor tumoral, aunque también es importante la ulceración o no del tumor. Si existe afectación ganglionar, el principal factor pronóstico es el número de ganglios linfáticos infiltrados por células de melanoma, además del espesor o la ulceración del tumor primario. Los pacientes con un solo ganglio afecto tienen una supervivencia a los 3 años del 40%, frente al 26% si se afectan de 2 a 4 ganglios y el 15% si existen metástasis en 5 ó más ganglios (*Balch y cols, 1981*). Cuando la enfermedad está diseminada, la supervivencia estimada es inferior a seis meses, de modo que menos de un 5% de pacientes sobreviven pasados 5 años. En este caso, los únicos parámetros con valor pronóstico son el número de metástasis y la localización anatómica de las mismas, que determinan su resecabilidad (*Barth y cols, 1995*). La supervivencia es mayor cuando las metástasis se localizan en piel, tejido celular subcutáneo o ganglios linfáticos yuxtaregionales que cuando son viscerales (*Balch y cols, 1983*). En un estudio con 1.521 pacientes con melanoma, se demostró que el valor pronóstico de las metástasis ganglionares era similar al de las cutáneas, con una supervivencia media de 12,5 meses, y una supervivencia estimada a los 5 años del 14% (*Barth y cols, 1995*).

5.1.2. Sexo

En general, parece que el melanoma puede tener un pronóstico más favorable en la mujer que en el hombre (*Vossaert y cols, 1992; Miller y Neil, 1997*). En estudios multifactoriales, realizados en pacientes con melanoma cutáneo en estadio I, se ha confirmado el sexo femenino como un factor pronóstico independiente de otros parámetros como la edad, el espesor tumoral y la localización de la lesión primaria (*Clark y cols, 1989; Sondergaard y Schou, 1985*). Algunos autores han demostrado que el sexo posee valor pronóstico independiente en pacientes con melanoma en estadio I y espesor comprendido entre 0,76 y 1,49 mm., pero no han encontrado que tenga valor predictivo en

pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad (II y III) (*Balch y cols, 1992*). Sin embargo, en otros estudios se ha descrito que las pacientes de sexo femenino con melanoma metastásico presentan mayor tiempo de supervivencia que los enfermos de sexo masculino con igual estadio de la enfermedad (*Richardson, 1999*). Por tanto, es posible que el supuesto mejor pronóstico del melanoma en la mujer sea independiente del estadio clínico de la enfermedad (*Cochran y cols, 2000*).

5.1.3. Edad

Diversos estudios multivariantes en pacientes con melanoma no han concedido a la edad un valor pronóstico independiente, ya que los pacientes de mayor edad suelen poseer melanomas de mayor espesor, lo cual podría estar justificado por una respuesta inmunológica menos eficiente y un diagnóstico con frecuencia más tardío. Es decir, la edad podría estar estrechamente ligada al espesor histológico de la lesión (*Vollmer, 1989*), y carecería entonces de valor predictivo independiente (*Sober y cols, 1991*). En este sentido, se ha descrito que el grosor medio de los melanomas diagnosticados a los 30 años es de 1,1 mm, mientras que a los 50 años es de 1,5 mm y a los 70 años de 2,8 mm. Quizás por ello, los pacientes menores de 50 años tienen una supervivencia a los 5 años del 46% y los mayores de 50 años del 35% (*Popescu y cols, 1990*). Sin embargo, otros autores han encontrado, tras realizar un análisis multivariante de 1.042 pacientes diagnosticados de melanoma, que la edad mayor de 60 años puede ser un factor independiente de mal pronóstico (*Cochran y cols, 2000*).

Aproximadamente un 2% de los melanomas ocurren en menores de 20 años, y un 0.3-0.4% en la edad prepuberal. Las tasas de supervivencia son similares a la edad adulta (*Tate y cols, 1993; Ceballos y cols, 1995*).

5.1.4. Localización

La localización anatómica de la lesión posee valor pronóstico independiente en estudios realizados con análisis multivariante (*Clark y cols, 1989; Cochran y cols, 2000; Balch y cols, 1992*). En líneas generales, las lesiones

localizadas en extremidades y, dentro de ellas, las situadas en extremidades superiores, poseen un mejor pronóstico que las localizadas en cabeza, cuello, tronco y áreas palmoplantares y subungueales (*Magnus, 1977*). Dentro de los melanomas de cabeza y cuello, los pacientes con lesiones localizadas en cuero cabelludo tienen peor pronóstico que las de cara o cuello, independientemente del espesor de la lesión (*Balch y cols, 1992*).

También existe marcada diferencia en cuanto al pronóstico según la localización sea axial o en extremidades. *Salman y Rogers* señalaron que las tasas de supervivencia a los 5 y 10 años eran del 94% y 87% respectivamente en pacientes con lesiones en extremidades, y del 91% y 63% para aquéllos con lesiones axiales (*Salman y Rogers, 1990*). Para explicar este diferente pronóstico se ha sugerido que los melanomas de localización axial pueden tener un diagnóstico más tardío, drenar a más de un territorio linfático y poseer mayor irrigación, lo cual favorecería la aparición de metástasis. Especial interés se le concedió en su momento a las lesiones de localización BANS (zona superior de la espalda: *back*; zona posterosuperior del brazo: *arm*; zona posterior y lateral del cuello: *neck*; y cuero cabelludo: *scalp*). La utilidad de este concepto ha sido muy debatida, y diversos estudios no han validado su valor predictivo (*Woods y cols, 1985; Cascinelli y cols, 1986*). Algunos autores señalan que tal vez el impacto pronóstico de la localización BANS esté ocasionado por la incorporación de zonas axiales (tronco, cabeza y cuello) (*Salman y Rogers, 1990*).

5.2. Factores pronósticos histológicos

La lista de factores histológicos que se han relacionado con el pronóstico del melanoma es muy extensa (*Ahmed, 1997*). En este capítulo se va a comentar el espesor de Breslow, principal factor pronóstico en el melanoma no metastásico, además de la ulceración y otras características anatomopatológicas del tumor.

5.2.1. Espesor de Breslow

En 1970, se comenzó a cuantificar el grosor del melanoma mediante el llamado índice o espesor de Breslow, considerando como tal el espesor del

melanoma medido verticalmente con un micrómetro ocular desde la parte más alta de la capa granulosa hasta la parte más profunda del tumor (*Breslow, 1970*). En las lesiones ulceradas, la medición se hace desde la superficie del cráter hasta el punto de máxima invasión del tumor. Numerosos estudios multivariantes han demostrado que el valor pronóstico predictivo de otros parámetros histológicos está realmente supeditado al espesor tumoral (*Fortea, 1987*), sobre todo en melanomas en estadio I (*Koh, 1991*). Dicho espesor se correlaciona directamente con la probabilidad de metástasis regionales y a distancia, así como con la supervivencia (*Morton y cols, 1993; Van der Esch, 1981*) (tabla II).

TABLA II. Supervivencia a los 5 años en pacientes con melanoma según el espesor de Breslow (mm.).

ESPESOR DE BRESLOW	SUPERVIVENCIA A LOS 5 AÑOS
≤ 0,75	92-95%
0,76 - 1,50	82-85%
1,51 - 4	66-75%
> 4	46-50%

Como se deduce de la tabla anterior, un 5-8% de los pacientes con melanomas de espesor de Breslow menor o igual a 0,75 mm, mueren por el tumor en los primeros 5 años tras el diagnóstico, frente al 50-54% de los pacientes con melanomas cuyo índice de Breslow es mayor de 4 mm. Por tanto, parece que el pronóstico debe ser multifactorial y puede depender de la interacción de otros parámetros para un espesor tumoral determinado. Especial interés han suscitado los melanomas de más bajo espesor en los que el curso de la enfermedad es fatal e impredecible por sus características histopatológicas. En una serie de 215 melanomas de espesor menor de 1 mm, se observó que las recurrencias estaban directamente relacionadas con el nivel de invasión y la localización de la lesión en cabeza y cuello (*Pontikes y cols, 1993*). En otra serie de 585 melanomas en estadio I y con espesor menor de 0,8 mm, se vió que la localización anatómica, el espesor tumoral, el nivel de invasión y la existencia de regresión eran factores pronósticos independientes (*Mansson-Brahme y cols, 1994*).

5.2.2. Nivel de invasión (nivel de Clark)

Clark y cols, definieron unos niveles anatómicos de invasión que se han venido empleando en la descripción histológica de los melanomas cutáneos primarios (Clark y cols, 1969):

- Nivel I. Proliferación estrictamente epidérmica (melanoma "in situ"). El tumor se encuentra situado por encima de la membrana basal.
- Nivel II. Las células tumorales atraviesan la membrana basal y ocupan parcialmente la dermis papilar. La invasión de un folículo se considera un nivel II.
- Nivel III. Invasión completa de la dermis papilar.
- Nivel IV. Invasión parcial o completa de la dermis reticular.
- Nivel V. Invasión de la hipodermis.

Hoy en día, el nivel de invasión de Clark ha pasado a ocupar un lugar secundario como factor pronóstico. La subjetividad en el método de medición, que implica una menor reproductibilidad, y las limitaciones en el caso de tumores ulcerados o localizados en zonas acras, han sido las principales críticas recibidas. (Colloby y cols, 1991). A pesar de ello, el nivel de invasión aporta información importante acerca del melanoma. Los niveles I y II de Clark identifican melanomas con patrón de crecimiento radial, y un nivel III o superior indica un patrón de crecimiento vertical. No obstante, en estudios estadísticos multivariantes se ha comprobado que el nivel de Clark carece de valor pronóstico como parámetro independiente (Morton y cols, 1993).

5.2.3. Ulceración

La ulceración del melanoma es un buen predictor de afectación ganglionar metastásica (Ahmed, 1997). En una serie de 8.500 melanomas, se demostró que la supervivencia a los 10 años en pacientes en estadio I y II de la AJCC, con lesiones ulceradas era del 50%, frente al 79% si no existía ulceración. También se observó que, aunque estaba fuertemente asociada con el espesor tumoral, la ulceración presentaba valor pronóstico independiente (Balch y cols, 1992).

Cuanto más ancha es el área de ulceración del tumor, peor es el pronóstico. Tan sólo un 5% de pacientes con melanomas con ulceración mayor de 6 mm sobreviven a los 5 años, frente al 44% si la ulceración es menor de 6 mm (*Slingluff, 1987*).

5.2.4. Tipo histológico

Los análisis estadísticos multivariantes de series amplias de melanomas no han encontrado que el tipo histológico tenga valor pronóstico independiente, ya que al ser analizado junto con el espesor tumoral, con el que está estrechamente relacionado, se observa que para un mismo espesor carece de valor pronóstico (*Koh y cols, 1984; Gordon y cols, 1991; Mansson-Brahme y cols, 1994*).

5.2.5. Índice mitótico

La tasa de mitosis del componente dérmico del melanoma cutáneo está correlacionada inversamente con la supervivencia del paciente (*Vollmer, 1989*). Aunque la actividad mitótica está relacionada con el espesor del tumor, tiene un efecto independiente en análisis multivariantes. Se ha demostrado una supervivencia a los 8 años del 79,4% en los pacientes con melanoma que tenían un índice mitótico de menos de $6/\text{mm}^2$, y del 38,2% en los que tenían un índice mitótico de más de $6/\text{mm}^2$ (*Clark y cols, 1989*). En los enfermos con melanomas de espesor intermedio (1,51-3,99 mm.), el 80% de los individuos que tenían melanomas con índice mitótico inferior a $6/\text{mm}^2$ sobrevivían a los 5 años, frente al 40% si el número de mitosis era superior a $6/\text{mm}^2$ (*Elder y cols, 1985*).

5.2.6. Índice pronóstico

Es el resultado de multiplicar el espesor de Breslow por el índice mitótico (*Schmoeckel y Braun-Falco, 1978*). El valor del índice pronóstico como variable independiente no ha sido demostrado en todos los estudios, por lo que algunos autores lo consideran como un parámetro pronóstico de segundo orden (*Vollmer, 1989*).

5.2.7. Tipo celular tumoral

Los estudios realizados para valorar el valor pronóstico del tipo celular en el melanoma resultan contradictorios, quizás por la falta de criterios estándares para encasillar los tipos celulares y también por la heterogeneidad celular dentro de un mismo tumor. Mientras que para algunos autores la variante fusocelular es la de mejor pronóstico (*Van der Esch y cols, 1981*), para otros es la de células nevoides (*McGovern y cols, 1981*). Según lo descrito en la literatura, el tipo celular no parece asociarse de manera importante con el pronóstico del melanoma.

5.2.8. Infiltrado inflamatorio

Clásicamente se ha aceptado que la presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear en la base del tumor es un factor de buen pronóstico. Sin embargo, estudios multifactoriales han demostrado que la intensidad de la respuesta inflamatoria disminuye conforme aumenta el espesor de la lesión, con el cual está estrecha e inversamente relacionada (*Day y cols, 1982*), por lo que carecería de valor pronóstico independiente (*Kopf, 1987*).

Strohal y cols., observaron que la densidad y localización del infiltrado variaba según el tipo de melanoma, siendo significativamente más intenso en el MES que en el MN; en cuanto a las metástasis de melanoma, su infiltrado era escaso o ausente. En todos los casos, el infiltrado estaba constituido sobre todo por linfocitos CD3⁺ (linfocitos T). En los melanomas finos (<0,75 mm de espesor de Breslow) predominaban los linfocitos T CD4⁺, y conforme se incrementaba el espesor tumoral aumentaban los linfocitos T CD8⁺ y las células CD16⁺, sugiriendo un cambio en la respuesta antitumoral del huésped (*Strohal y cols, 1994*).

5.2.9. Regresión

La regresión espontánea de un tumor se define como su desaparición parcial o completa en ausencia de tratamiento, y se ha descrito en el 10-58% de los melanomas. Esta variabilidad se ha atribuido a los diferentes criterios empleados para definirla (*Salman y cols, 1990*). Histológicamente, la regresión

tumoral se caracteriza por un estroma engrosado en dermis papilar, con ausencia de células tumorales, y un número variable de melanófagos y linfocitos. Las zonas de tumor con infiltración linfocitaria y macrófagos se consideran áreas de respuesta activa del huésped, pero no de regresión.

La regresión se asocia con mal pronóstico en los melanomas de menos de 0,76 mm de espesor, pues más de un 20% desarrollan metástasis tras 6 años de seguimiento, frente a tan sólo un 2% de los que no presentan signos de regresión (*Gromet y cols, 1978*). También es importante la intensidad de dicha regresión, ya que los melanomas finos con regresión de más del 77% del tumor se han asociado con una mayor frecuencia de metástasis que los tumores con menor grado de regresión (*Ronan y cols, 1987*). Una explicación puede ser que las lesiones posean un mayor espesor antes del inicio de los fenómenos de regresión. Se ha observado que la frecuencia de regresión histológica se correlaciona inversamente con el espesor de la lesión: 46% en los melanomas con menos de 1,5 mm de índice de Breslow; 32% si dicho índice es entre 1,5 y 3 mm; y 9% si el espesor es mayor de 3mm (*Blessing y McLaren, 1992*). Shaw y cols., señalaron que los melanomas de bajo espesor con amplias zonas de regresión solían poseer metástasis linfáticas regionales en el momento del diagnóstico. Dichos autores especularon que el estímulo del sistema inmunitario del huésped por parte de las células malignas a nivel del tejido linfático podía provocar la respuesta inmunológica responsable de la regresión de la lesión primaria (*Shaw y cols, 1989*). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias significativas en cuanto a la aparición de metástasis entre los melanomas finos, con regresión o sin ella (*Kelly y cols, 1985*). Estas discrepancias podrían deberse a la falta de criterios estandarizados para considerar los fenómenos de regresión.

5.2.10. Invasión vascular

La invasión de los vasos linfáticos o sanguíneos, definida como la presencia de células tumorales en cavidades tapizadas por endotelio, está íntimamente relacionada con la existencia de satelitosis y, aunque su presencia no está unida invariablemente a la aparición de metástasis, sí que es un

importante factor predictivo de la existencia de metástasis ganglionares (*Larsen y Grude, 1979*).

5.2.11. Satelitosis microscópica

Consiste en acúmulos de más de 0,05 mm de diámetro de melanocitos tumorales en los alrededores del tumor, separados de éste por haces de colágeno o grasa. Debe diferenciarse de las recurrencias locales a partir de células de melanoma que no han sido resecaadas completamente, observándose en estos casos proliferaciones de melanocitos atípicos en el interior o en continuidad con las cicatrices de extirpación de la lesión primaria. La satelitosis microscópica aumenta el riesgo de desarrollar metástasis en los ganglios linfáticos regionales y se asocia con una menor supervivencia del paciente. El 53% de pacientes con satelitosis microscópica desarrollan metástasis de melanoma en los ganglios linfáticos regionales frente al 12% de pacientes sin satelitosis (*Harrist y cols, 1984*). En un estudio de análisis multivariante en una serie de 384 melanomas en estadio I de la OMS (enfermedad localizada), se demostró que la presencia de microsateletosis tenía un valor predictivo independiente como marcador de mal pronóstico, con una supervivencia a los 5 años del 36%, frente al 89% cuando no aparecían microsateletosis (*Leon y cols, 1991*).

6. INMUNIDAD TUMORAL

El sistema inmunitario es el encargado de defender al organismo frente a agentes extraños a través de lo que se ha denominado vigilancia inmunológica, de modo que, potencialmente, dicho sistema puede reconocer antígenos tumorales y dirigir respuestas, tanto de tipo celular como humoral, para intentar erradicar las células malignas (*Medina y cols, 1996*). Dentro del organismo, la piel no es una excepción y, en ella, el desarrollo de tumores también parece estar condicionado por el funcionamiento del sistema inmunitario. A favor de esta hipótesis se encuentra el aumento demostrado en la incidencia de tumores de piel

entre los pacientes transplantados con inmunosupresión terapéutica (*Lindelof y cols, 2000*).

6.1. El complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del ser humano, es una región muy polimórfica, localizada en el cromosoma 6, cuyos productos génicos se expresan en la superficie de la mayoría de las células. Este complejo, se divide en tres regiones, que dan lugar a las moléculas HLA (antígeno leucocitario humano) de clase I, II y III. La región de clase I incluye los locus HLA-A, -B y -C, que contienen los genes que codifican para los antígenos HLA clásicos de transplante (*Lechler y cols, 1995*). La región de clase II posee algunos de los genes responsables de la respuesta inmunitaria, como HLA-DR, -DQ, y -DP (*Lechler y cols, 1995*). En la región de clase III se localizan genes que codifican proteínas no relacionadas con la respuesta inmunitaria específica.

En la respuesta inmunitaria frente a tumores, las moléculas codificadas por los genes del MHC tienen un papel relevante en el reconocimiento de los antígenos tumorales por las células inmunocompetentes, como se explicará más adelante en este capítulo.

6.2. La respuesta antitumoral

Dentro de la respuesta inmunitaria de tipo celular, la primera barrera defensiva está integrada por los efectores de la inmunidad natural o innata: células dendríticas, macrófagos y células "asesinas naturales" o NK (del inglés, "*natural killer*"). Las células NK, principales efectoras de dicha inmunidad natural, poseen la capacidad de destruir células tumorales sin especificidad de antígeno, fuera del contexto de las moléculas HLA.

Junto a la respuesta celular innata, también participan los componentes de la respuesta celular adquirida, específica de antígeno. Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) son los principales efectores de esta respuesta. Estas células no reconocen a los antígenos intactos aislados, sino a los péptidos derivados de un antígeno unidos no covalentemente a moléculas codificadas por el MHC. Los

CTLs poseen el receptor de célula T (TcR) y durante la fase de reconocimiento del antígeno pueden requerir la participación de distintas señales (Marín L, 1997; García y Minguela, 1997), entre las que destacan:

- a) **Señal de reconocimiento o cognitiva**, que implica al complejo TcR-antígeno-MHC. Las células presentadoras de antígeno (APCs), captan y procesan el antígeno tumoral para obtener péptidos que después presentarán a las células T CD8⁺ o CD4⁺, en asociación con moléculas HLA de clase I o II respectivamente.

- b) **Señales coestimuladoras o segundas señales**, que estabilizan la unión del complejo TcR-antígeno-MHC, y son aportadas por las moléculas CD28/CTLA-4, que se ligan a CD80/CD86, y por las moléculas de la superfamilia del receptor del TNF (factor de necrosis tumoral), como CD40 y CD95, que interaccionan con sus respectivos ligandos.

Con respecto a la respuesta inmunitaria de tipo humoral, está mediada en parte por los anticuerpos secretados por los clones activados de las células B específicas de antígeno. La destrucción de las células tumorales mediante anticuerpos es posible gracias a mecanismos como la activación del complemento, opsonización y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las vías celular y humoral de la respuesta inmunitaria no actúan de modo independiente, sino que están relacionadas a través de la secreción de citoquinas y de las interacciones directas entre células (figura 1). Así, las células del sistema inmunitario inespecífico pueden fagocitar antígenos, procesarlos hasta conseguir péptidos antigénicos y presentar éstos a las células T, las cuales, tras reconocer dichas moléculas antigénicas, son activadas y se convierten en células T efectoras citotóxicas (CTLs). Una vez activadas las células T, éstas poseen la capacidad de producir factores solubles o citoquinas que, a su vez, estimulan la función citolítica de las células de la respuesta innata y específica, e inducen la producción de anticuerpos por los linfocitos B (tras su diferenciación a células plasmáticas) (Minguela y Álvarez, 1997).

7. PRINCIPALES CÉLULAS QUE PARTICIPAN EN LA RESPUESTA INMUNITARIA ANTITUMORAL

En la respuesta inmunitaria antitumoral intervienen de forma directa o indirecta diversos tipos de células, entre las que destacan las que se detallan a continuación.

7.1. Linfocitos T

Los linfocitos T participan directamente en la respuesta específica de antígeno y regulan la actividad de otros tipos celulares mediante la secreción de citoquinas. En función de la distinta coexpresión de moléculas de superficie, los linfocitos T se pueden clasificar en diferentes subtipos (*Torío y Moya, 1997*):

7.1.1. Linfocitos T colaboradores

Son células de fenotipo $CD3^+CD4^+$. Poseen un receptor heterodimérico formado por cadenas α y β . Estos linfocitos se activan tras reconocer el complejo péptido antigénico-HLA de clase II, tras lo cual liberan factores solubles o citoquinas, que a su vez actúan sobre otros linfocitos, T y B, y APCs (figura 1). De este modo, los linfocitos T colaboradores (Th) pueden regular las respuestas inmunitarias celular y humoral. Los linfocitos Th también puede ejercer un efecto citolítico directo, papel que hasta hace poco se consideraba reservado a los linfocitos T $CD8^+$ (*Brodsky y cols, 1996; Wang, 2001*).

7.1.2. Linfocitos T citotóxicos/supresores

Poseen el fenotipo $CD3^+CD8^+$ y su receptor contiene cadenas α y β . Estas células reconocen los complejos péptido antigénico-HLA de clase I, tras lo cual se activan y adquieren capacidad lítica, proceso que permite la destrucción de células tumorales (*Bevan, 1995*).

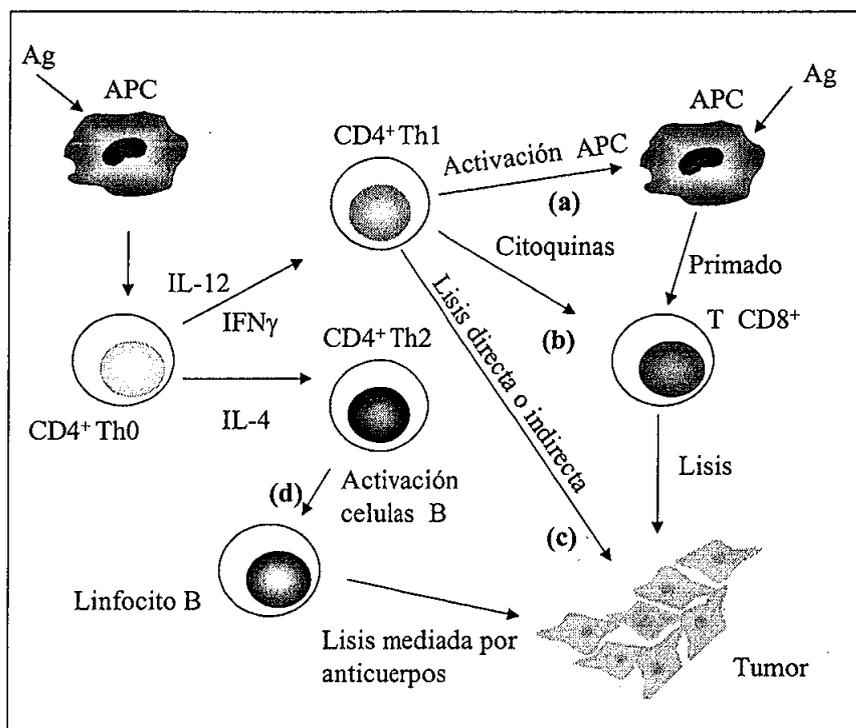


FIGURA 1. Papel de las células T CD4⁺ en la regulación de la respuesta inmunitaria antitumoral. Las células T CD4⁺ juegan un papel primordial en la regulación de estas respuestas a través de diversos mecanismos: (a) Colaboran en el estímulo inicial de las células T CD8⁺, a través de la activación de la APC tras reconocer ésta el antígeno tumoral (Ag). (b) Secretan citoquinas necesarias para la función y proliferación de la célula T CD8⁺. (c) Pueden producir la lisis del tumor de modo directo o indirecto. (d) Colaboran en la activación de la célula B. (Modificado de Wang, 2001).

7.1.3. Linfocitos T γ/δ

Representan aproximadamente el 5% de las células T en sangre periférica. Son células CD3⁺CD4⁻CD8⁻, cuyo TcR es un heterodímero formado por cadenas de tipo γ y δ . Su papel en la inmunidad antitumoral no está totalmente definido.

7.1.4. Células NKT

Suponen alrededor del 5% de las células T en sangre periférica. Son linfocitos CD3⁺CD56⁺ que, a través del TcR, pueden responder ante antígenos que producen estimulaciones crónicas del sistema inmunitario pero que no

necesariamente son presentados en el contexto clásico del MHC (*Quirós-Roldán y cols, 1996*).

7.2. Linfocitos B

Hasta fechas recientes, la principal función reconocida para los linfocitos B (células CD19⁺) en la respuesta inmunitaria era la producción de anticuerpos tras su diferenciación a célula plasmática. Sin embargo, comienza a cobrar cada vez mayor importancia la capacidad del linfocito B para la captación, procesamiento y presentación de antígenos, pudiendo actuar en determinadas circunstancias como una APC *no profesional*. En este sentido, las células B aumentan su capacidad coestimuladora tras ser estimuladas por la vía CD40/CD40L (*Ding y Shevach, 1996*) y pueden participar en el estímulo de los CTLs.

7.3. Células NK

Las células NK constituyen el 10-15% de los linfocitos de sangre periférica y no expresan la molécula CD3 ni el TcR. Aunque no se conoce ningún antígeno de superficie que identifique sin ambigüedad a estas células, la mayoría son linfocitos CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (*Rubio y García, 1997*).

El CD16 es el receptor de baja afinidad para la región Fc de la IgG (fracción constante de la inmunoglobulina G) y, aunque forma parte de una de las vías de activación de las células NK, no es exclusivo de las mismas, ya que también lo expresan neutrófilos, eosinófilos, y algunos macrófagos y células T. A través de la molécula CD16, las células NK pueden transformarse en células LAK (*lymphocyte activated killer*), con mayor potencia antitumoral.

El CD56 es un antígeno de superficie que se encuentra en todas las células que expresan citotoxicidad no restringida por el MHC. Sin embargo, no todos los linfocitos CD56⁺ son células NK típicas. Como ya se ha señalado, una pequeña fracción de células citotóxicas de sangre periférica son CD3⁺CD56⁺, son las células NKT. La mayor parte de las células CD56⁺ expresan CD16, pero alrededor

del 10% de las células NK de sangre periférica son de fenotipo CD56⁺CD16⁻ (Lanier y cols, 1986).

En general, las células NK constituyen una población heterogénea que durante años se ha intentado clasificar en función de su fenotipo. Se han considerado dos subpoblaciones de células NK en función de la mayor o menor intensidad de expresión de la molécula CD56, de modo que las que expresan CD56 con mayor intensidad serían menos citotóxicas (Cooper y cols, 2001).

Una característica de las células NK es su capacidad de actuar reconociendo y eliminando células anormales que no expresan moléculas MHC de membrana y que, por tanto, no son accesibles a la respuesta específica que llevan a cabo los linfocitos T. Además de por su actividad citolítica directa, las células NK también constituyen una parte importante de la respuesta antitumoral por su capacidad de producción de citoquinas, como IL-2, IL-12, TNF e INF γ , que potencian dicha respuesta (Rubio y García, 1997).

7.4. Monocitos

La capacidad de los monocitos para lisar las células tumorales se debe a la liberación de enzimas lisosomales y radicales libres tras ser convenientemente activados (Mantovani y cols, 1992). Además, tras la activación de los monocitos, se favorece la producción de citoquinas como el INF γ y el TNF α que amplifican las respuestas de tipo celular frente a las células tumorales (Webb y cols, 1991). Las células mielomonocíticas pueden participar en reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Holland y Gallin, 1998).

7.5. Células presentadoras de antígeno (APCs)

Las APCs son un grupo heterogéneo de células derivadas de la médula ósea, con una amplia distribución en el organismo, responsables de captar el antígeno, procesarlo y presentarlo a los linfocitos T, en el entorno de las moléculas HLA. Para que dicha presentación sea eficiente, además de la señal cognitiva TcR-MHC, deben aportar una serie de señales coestimuladoras que

contribuyen a la estabilización de la denominada “sinapsis inmunológica” (figura 2. Estas señales se producen gracias a la expresión de diversas proteínas en la superficie celular y la secreción de otras moléculas al medio extracelular, que se describirán después con mayor detalle. Existen dos tipos de APCs (Marín, 1997):

7.5.1. APCs profesionales

Expresan HLA de clase II de forma constitutiva. Incluyen a las células dendríticas (DCs), monocitos y linfocitos B activados, siendo las primeras las que poseen mayor capacidad para estimular a los linfocitos T. Las DCs captan el antígeno y migran a los ganglios linfáticos, donde lo concentran y presentan al linfocito T.

7.5.2. APCs facultativas

Pueden expresar HLA de clase II después de la exposición a determinadas citoquinas, como IFN γ y TNF (Adams y cols, 1992). Incluyen queratinocitos, células endoteliales, e incluso a los propios linfocitos T activados, aunque parece que la misión de estos últimos es actuar como APC negativa, de modo que cuando presentan el antígeno a otros linfocitos T activados tienden a inducir en ellos un estado de anergia o ausencia de respuesta (Pichler y Wyss-Coray, 1994).

8. MOLECULAS COESTIMULADORAS: CD28, CTLA-4, CD80, CD86.

Como ya se ha señalado previamente, el modelo de la doble señal para la activación linfocitaria postula que para activar de modo óptimo al linfocito T se requiere una señal antigénica específica, dirigida al TcR, y una señal coestimuladora que incremente la adhesión del linfocito T a la APC. Las moléculas coestimuladoras no son específicas de antígeno y se encuentran sobre la superficie tanto de los linfocitos B y T como de las APCs. Dichas moléculas modulan la calidad de las señales desencadenadas por la unión al TcR, de modo

que resultan determinantes para la activación clonal de la célula T o, por el contrario, cuando están ausentes o en baja proporción, para inducir tolerancia o anergia (Clark y Ledbetter, 1994).

Una de las interacciones con función coestimuladora mejor estudiada y mayor relevancia en la regulación de la respuesta inmunitaria, es la que se produce entre las moléculas CD28 y CTLA-4, presentes en la superficie del linfocito T, y las moléculas de la familia B7, localizadas sobre la APC (figura 2). Las moléculas B7.1 y B7.2 (también denominadas CD80 y CD86 respectivamente), se ligan al CD28 de las células T en reposo, y al CTLA-4 de las células T activadas, y regulan la activación o el silenciamiento de la respuesta inmunitaria (Krummel y Allison, 1995).

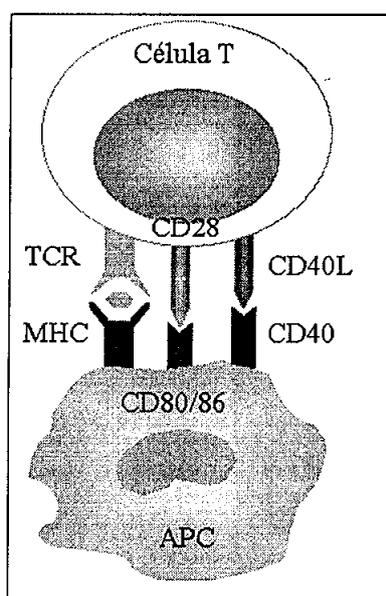


FIGURA 2. Esquema de la "sinapsis" entre la APC y la célula T. La APC presenta el complejo constituido por el péptido antigénico y la molécula MHC a la célula T, a través del receptor de esta última (TCR). Para que la activación de la célula T sea efectiva, se requieren una serie de señales coestimuladoras, como las proporcionadas por la interacción entre las moléculas CD28 y CTLA-4 de las células T con las moléculas CD80 y CD86 de la APC. También es importante la colaboración de la vía CD40/CD40L.

8.1. Moléculas CD28 y CTLA4

La molécula CD28 es una proteína que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas, y se expresa en el 50% de las células T CD8⁺, concretamente en aquellas con función citotóxica, y en el 95% de las células T CD4⁺ (Van Gool y cols, 1996). La coestimulación a través de CD28 no sólo es capaz de evitar la anergia inducida en la célula T tras la señalización por TcR, sino que estimula la actividad citotóxica de dicha célula T y aumenta el ritmo de transcripción de citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 (Rulifson y cols, 1997). Sin embargo,

cuando CD28 se liga en ausencia de estimulación a través del complejo TcR/CD3, no induce proliferación ni producción de citoquinas por las células T, sino que las inhibe y disminuye la expresión de CD28 (*Boussiotis y cols, 1996*).

La molécula CTLA4 se expresa sobre los linfocitos T activados CD28⁺, tanto CD4⁺ como CD8⁺, y sobre los linfocitos B activados (*Chambers y cols, 1996*). En humanos, existe un 31% de homología entre CTLA-4 y CD28, y dado que los genes de ambas moléculas tienen una localización próxima en el cromosoma 2, se cree que pueden haberse generado por duplicación de un gen ancestral común. La expresión de CTLA-4 se produce tras la estimulación del complejo TcR/CD3, y se potencia por la coestimulación de CD28 (*Walunas y cols, 1996*). La densidad máxima de expresión de CTLA-4 se alcanza a las 72 horas del estímulo de la célula T, y supone sólo el 3% de la densidad de expresión de CD28. Sin embargo, la avidéz con que CTLA-4 se una a su ligando es 20 veces superior a la de CD28. Mientras que CD28 conduce la fase de estimulación de la respuesta inmunitaria, activando las células T a través de su contacto con las moléculas B7, CTLA-4 parece que inhibe dicha respuesta para hacerla terminar (*Liu, 1997*).

8.2. Moléculas CD80 y CD86

La molécula CD80 (B7.1) tiene una estructura en dominios similar a la familia de las inmunoglobulinas, y se expresa de forma constitutiva en las DCs. No se expresa en monocitos, ni linfocitos T ni B, en reposo, pero sí cuando están activados.

La molécula CD86 (B7.2) también tiene una estructura parecida a la familia de las inmunoglobulinas, y se expresa en la membrana de monocitos en reposo y en linfocitos B a las 24 horas de su estimulación, mientras que CD80 no es detectable hasta las 48 horas. Debido a estas diferencias en la cinética de expresión de CD86 en el linfocito B, se ha especulado con la posibilidad de que CD86 pueda estar implicado fundamentalmente en el inicio de la respuesta proliferativa de la célula T, mientras que CD80 estaría relacionado con la ampliación y mantenimiento de la misma (*Boussiotis y cols, 1996; Natarajan y cols, 2001*).

Tanto CD80 como CD86 pueden funcionar en humanos como moléculas estimuladoras de la citotoxicidad mediada por células NK, de modo análogo a lo que ocurre en ratones, donde la expresión de B7.1 ó B7.2 por las células de melanoma murino B16.F1 las hace más susceptibles a la lisis por células NK humanas. El estímulo de las células NK humanas por CD80 y CD86 parece ser independiente de CD28 y CTLA-4, aunque es posible que las interacciones tengan lugar con variantes de CD28 y CTLA-4 que no son reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-CD28 o anti-CTLA-4 empleados para su detección (*Wilson y cols, 1999*).

9. MOLECULAS DE LA SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL Y SUS LIGANDOS

Las moléculas incluídas en la superfamilia del receptor para el factor de necrosis tumoral (TNF-R) son un grupo de proteínas transmembrana que incluye el CD40, CD95 (Fas, APO-1), TNF-RI, TNF-RII, CD30, CD27, OX-40, 4-IBB y otras. La mayoría de los ligandos para estas moléculas son proteínas transmembrana que presentan analogía con la secuencia del TNF y la linfotoxina α (*Richar y Armitage, 1994*). De la mencionada relación de moléculas, se van a exponer a continuación las dos primeras y sus correspondientes ligandos.

9.1. Moléculas CD95 y CD95L

La molécula Fas (CD95), es una proteína de superficie celular que se expresa en células T activadas (CD45RO⁺) de sangre periférica, pero no en linfocitos T vírgenes (CD45RA⁺), y también se puede expresar en linfocitos B, monocitos y neutrófilos (*Klas, 1993*). Fas parece expresarse igual en los linfocitos Th1 que en los Th2, mientras que su ligando (FasL) lo hace sobre todo en los Th1 activados.

La molécula Fas puede mediar la apoptosis, es decir, la muerte celular controlada genéticamente, que sigue un patrón ordenado de cambios

morfológicos y bioquímicos. FasL induce apoptosis mediante la activación de Fas en la células diana que expresan esta última.

El sistema Fas es uno de los tres principales caminos empleados por los CTLs para destruir las células diana, pero también es un elemento clave para disminuir la población de linfocitos T como parte de la homeostasis de la respuesta inmunitaria. La mayoría de las células del sistema inmunitario expresan Fas y/o FasL, constitutivamente o después de su activación. La expresión de CD95L en algunos tejidos normales, como el testículo o el ojo, mantiene el estado de tolerancia inmunitaria eliminando los leucocitos infiltrantes CD95⁺. Además, en algunas situaciones patológicas, como en la hepatitis alcohólica, comienza a expresarse CD95L en tejidos que no tenían esta proteína cuando estaban sanos, a modo de control negativo para limitar la inflamación (*Galle y cols, 1995*). Los ratones que no expresan Fas ni FasL, o cuando éstas no son funcionales, presentan un incremento en la población de células linfoides y una mayor frecuencia de fenómenos autoinmunes (*Nagata y Suda, 1995*).

9.2. Moléculas CD40 y CD40L

La glicoproteína CD40 se expresa en gran variedad de células, como linfocitos B, DCs, monocitos, células del endotelio vascular, queratinocitos, fibroblastos y, con niveles bajos, en los linfocitos T. El estímulo de la molécula CD40 induce, en las células que la poseen, la expresión de HLA y de moléculas coestimuladoras y de adhesión, así como la producción de citoquinas proinflamatorias (*Grewal y Flavell, 1998*). De este modo, se amplifica la respuesta inmunitaria y se evita la inducción de tolerancia o anergia. La vía CD40 también induce la diferenciación y la función efectora de las células T, tanto CD4⁺ como CD8⁺ (*Noelle, 1998*), y estimula la proliferación y diferenciación de las células B. El estímulo de los monocitos vía CD40 también podría aumentar su actividad antitumoral (*Stout y Suttles, 1996*).

En resumen, la vía CD40, igual que la interacción de CD80 y CD86 con CD28, es un elemento de regulación tanto de la respuesta inmunitaria humoral como de la mediada por células (*Schoenberger y cols, 1998*). Las interacciones CD40-CD40L son críticas para conseguir la expansión de células T cooperadoras

CD4⁺ y células T citotóxicas CD8⁺ así como para la activación y maduración de las células B y las DCs (*Durie y cols, 1994; Carbone y cols, 1997; Diehl y cols, 1999*).

El ligando del CD40 (CD40L ó CD154), es una proteína transmembrana expresada fundamentalmente en las células T CD4⁺ activadas, aunque también se expresa en las células CD8⁺ activadas, linfocitos B, DCs, mastocitos y eosinófilos (*Grewal y Flavell, 1998*).

10. CITOQUINAS

Las citoquinas son polipéptidos solubles que regulan las respuestas inmunitarias del organismo. Sus acciones a menudo son redundantes, y pueden ejercer efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos. Aunque los linfocitos T, junto con los monocitos, son la principal fuente de citoquinas, éstas también pueden ser producidas por otras células y actuar sobre prácticamente todos los tejidos para regular su crecimiento, diferenciación y función (*Minguela y Álvarez, 1997*).

Las citoquinas ejercen su acción uniéndose a receptores específicos localizados en la membrana celular. Estos receptores tienen una afinidad muy alta por sus ligandos, por lo que cantidades muy pequeñas de citoquinas (10^{-9} - 10^{-12} M) son suficientes para ejercer su acción. Las células sobre las que actúan pueden ser las mismas que las producen (acción autocrina), células vecinas (acción paracrina), o bien, células distantes (acción endocrina).

Inicialmente, los linfocitos Th del ratón se dividieron en dos subtipos en virtud del patrón de citoquinas que producían, con diferentes propiedades funcionales (*Mosmann y Coffman, 1989*). El subtipo 1 (Th1) libera interferón γ (IFN γ), interleuquina-2 (IL-2), IL-12, IL-15 y factor de necrosis tumoral β (TNF β). El subtipo 2 (Th2) libera IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (*Janeway y cols, 1998*). El IFN γ inhibe la respuesta Th2, mientras que la IL-4 e IL-10 inhiben la respuesta Th1 (*Powne y Coffman, 1993*). En humanos, la distinción entre ambos subtipos de linfocitos no es tan absoluta, de modo que, por ejemplo, la IL-10 también es producida por los linfocitos Th1 (*Del Prete y cols, 1993*).

En la actualidad podemos distinguir, dependiendo de la función que desempeñan, cuatro tipos de citoquinas (*Minguela y Álvarez, 1997*):

- a) Estimuladoras de la inmunidad natural, normalmente producidas por monocitos. Median la respuesta inmunitaria contra virus y bacterias. A este grupo pertenecen IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, INF α y β , y TNF.
- b) Reguladoras de la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos T específicos. Son secretadas por los linfocitos T CD4⁺ tras activarse en respuesta a su antígeno específico. Engloban la IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17 y el factor de crecimiento tumoral β .
- c) Inductoras de la actividad de células inflamatorias inespecíficas estimuladas por la activación, específica de antígeno, del linfocito T. Aquí se incluyen el INF γ y la IL-5.
- d) Estimuladoras de la hematopoyesis. Inducen el crecimiento y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea, lo cual permite renovar las células consumidas durante las respuestas inmunitaria e inflamatoria. A este grupo de citoquinas pertenecen IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14 y los factores estimuladores de colonias de granulocitos-macrófagos, monocitos-macrófagos o granulocitos.

10.1. Interferón γ

El INF γ puede ser secretado por los linfocitos T activados, tanto CD8⁺ como CD4⁺, fundamentalmente del subtipo Th1, y en menor grado, por las células NK tras la activación de las mismas (*Mosmann y Coffman, 1989*).

El INF γ colabora en la activación y diferenciación de los linfocitos T y B (*Maggi y cols, 1992*). Dicha citoquina incrementa en muchos tipos celulares la expresión de moléculas HLA de clase I y II, y de moléculas coestimuladoras (*Kooy y cols, 1999*), facilitando así la activación de los linfocitos T. El INF γ también es un potente activador de la capacidad citolítica de los monocitos y las células NK, y de la síntesis de otras citoquinas.

El papel del INF γ como inhibidor del crecimiento de las células de melanoma humano *in vitro* está bien documentado (*Garbe y cols, 1990; Garbe y Krasagakis, 1993*). Esta citoquina puede aumentar la expresión de moléculas del MHC de clase I y II en células derivadas de melanomas primarios, pero no de metástasis de melanoma (*Andalib y cols, 1997*); de este modo, las células

malignas que expresan más HLA se hacen más sensibles a la lisis mediada por CTLs, aunque menos susceptibles a la destrucción por células NK (*Reiter, 1993*).

10.2. Interleuquina 15

La IL-15 es una citoquina de reciente descubrimiento que, aunque no guarda homología con la IL-2, requiere el uso de las cadenas β y γ_c del IL-2R para unirse y transmitir su señal. No obstante, la IL-15 posee también un receptor específico, el IL-15R α (*Giri y cols, 1995*).

Mientras que la IL-2 es producida por los linfocitos T, la IL-15 se genera sobre todo en tejidos no linfoides por monocitos y macrófagos, fibroblastos, células del endotelio vascular y células epiteliales (*Bamford y cols, 1997*).

La IL-15 comparte actividades funcionales con la IL-2, como el estímulo de la proliferación y activación de las células T, B y NK (*Gamero y cols, 1995*). Pero, además, la IL-15 realiza otras funciones biológicas no compartidas con la IL-2. Esta última citoquina, a través de su papel en la muerte celular inducida por activación, está implicada en la tolerancia periférica a través de la eliminación de las células T autorreactivas. Por el contrario, la IL-15 manifiesta acciones antiapoptóticas, inhibe la muerte celular inducida por activación mediada por IL-2 y estimula la persistencia de células T memoria CD8⁺, incluyendo aquellas que son autorreactivas (*Waldmann y cols, 2001*). Por ello, la IL-15 podría favorecer enfermedades autoinmunes inflamatorias como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal (*Bamford y cols, 1997*). Además, la IL-15 estimula la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 e IL-6. Por todo ello, se han propuesto tratamientos basados en la inhibición de la IL-15 para el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes (*Bamford y cols, 1997*).

10.3. Interleuquina 6

La IL-6 es una molécula originariamente identificada como derivada de las células T, pero que también puede ser sintetizada por otras células como monocitos, células del endotelio vascular y fibroblastos. Dicha citoquina estimula a los linfocitos T y timocitos, promoviendo la síntesis de IL-2, e induce la maduración del linfocito B hacia la célula plasmática (*Kishimoto, 1989*). Las

actividades biológicas de la IL-6 difieren según las células donde actúa. Así, puede actuar como factor inhibidor o estimulador del crecimiento celular, dependiendo de la naturaleza de la célula diana (*Hirano y cols, 1990*).

10.4. Interleuquina 10

La IL-10 fue denominada factor inhibidor de la síntesis de citoquinas, porque se asoció con la inhibición de la producción de citoquinas por las células Th1 murinas (IL-2 e $\text{INF}\gamma$, sobre todo) (*Fiorentino y cols, 1989*). En condiciones normales, en humanos, la IL-10 puede ser producida por monocitos, linfocitos T CD8^+ y CD4^+ , linfocitos B, células del estroma y queratinocitos (*Enk y Katz, 1992*).

La IL-10 inhibe la proliferación de las células T específicas de antígeno directamente, mediante la inhibición de la producción de IL-2 (*Taga y Tosato, 1992*), e indirectamente, por disminución de la capacidad de los monocitos para presentar antígenos tumorales a los linfocitos T a través de la reducción en la expresión de HLA de clase II (*de Waal Malefyt y cols, 1991*). La IL-10 reduce la expresión de moléculas de membrana como HLA-DR, CD80 y CD86 sobre las APCs (*Buelens y cols, 1995; Koppelman y cols, 1997*). El tratamiento de las células dendríticas con IL-10 las convierte en APCs tolerogénicas, las cuales inducen un estado de anergia en los CTLs CD8^+ (*Steinbrink y cols, 1999*). La IL-10 también bloquea la liberación de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos activados (*Kambayashi y cols, 1995*).

Aunque la IL-10 parece trabajar como un supresor general de las respuestas inmune e inflamatoria, también puede incrementar la actividad de los CTLs (*Chen y Zlotnik, 1991*) y actuar como un potente factor de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (*Rousset y cols, 1992*).

11. POLIMORFISMO DE CITOQUINAS

Mediante estudios *in vitro* se ha visto que cuando las células de una serie de individuos, no relacionados entre sí, son estimuladas apropiadamente, producen diferentes cantidades de una misma citoquina. Además, un mismo

individuo puede ser alto secretor de una determinada citoquina y bajo productor de otra, lo cual es regulado por mecanismos específicos de cada citoquina, y no por un mecanismo global (*Hutchinson y cols, 1999*). Cuando un sujeto tiene una capacidad de síntesis de una determinada citoquina, esta capacidad se suele mantener más o menos constante en el tiempo, como un rasgo característico de cada individuo. En general, los niveles de producción de un individuo alto secretor para una determinada citoquina son unas 10 veces superiores a los niveles de dicha citoquina en un sujeto bajo secretor, aunque en el caso de algunas citoquinas se han encontrado diferencias mayores (*Hutchinson y cols, 1999*).

En la especie humana se han demostrado diferentes polimorfismos en los genes que regulan el nivel de producción de citoquinas. Las diferencias alélicas pueden estar localizadas en la región promotora (*Turner y cols, 1997*), en la región intrónica (*Pravica y cols, 1999*), o en la región codificante para la citoquina en cuestión (*Awad y cols, 1997*). Sin embargo, no todos estos polimorfismos se traducen en un distinto nivel de producción de citoquinas. Por ello, se ha prestado mayor atención al estudio de aquellos polimorfismos que pueden poseer más significación funcional.

Tras la descripción de tres puntos de polimorfismo en la región promotora del gen de la IL-10 (*Turner y cols, 1999*), se confirmó la asociación entre dicho polimorfismo y la actividad transcripcional del promotor de la IL-10 (*Crawley y cols, 1999*). Es decir, se pueden distinguir varios genotipos que se traducen en diferentes fenotipos según la capacidad de secreción de IL-10 sea alta, intermedia o baja. Cada vez se van encontrando más asociaciones entre el polimorfismo en la región promotora de la IL-10, y diversas patologías, como enfermedades autoinmunes (*Lazarus y cols, 1997; Crawley y cols, 1999*) o, más recientemente, enfermedades malignas como el melanoma (*Howell y cols, 2001*).

También se han demostrado tres fenotipos distintos según la capacidad de secreción de INF γ , mientras que sólo se han descrito altos o bajos secretores para la IL-6. Hasta el momento, las asociaciones entre el polimorfismo en los genes reguladores de la secreción de INF γ o de IL-6, no se han relacionado con distinta respuesta frente a células tumorales, pero sí, por ejemplo, con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso (*Schotte y cols, 2001*).

12. MECANISMOS DE ESCAPE A LA INMUNOVIGILANCIA EN EL MELANOMA

Desde un punto de vista clínico, la intervención del sistema inmunitario en la lucha contra el melanoma se apoya en observaciones como los fenómenos de regresión; la aparición concomitante de halo nevus, uveítis y/o vitíligo; la posibilidad de un prolongado intervalo libre de enfermedad entre la exéresis del tumor primario y el eventual desarrollo de metástasis; y la existencia de respuestas parciales o completas, aunque de corta duración, en pacientes que han recibido inmunoterapia (*Strohal y cols, 1994*).

Los melanomas presentan antígenos tanto de diferenciación melanocítica (expresados en melanocitos, pero no en otros tejidos normales) como específicos de tumor (compartidos con otros tumores). Entre los primeros se encuentran antígenos de la familia MAGE, BAGE y GAGE; entre los segundos, la tirosinasa, Melan-A/MART-1, Pmel17/gp100, TRP-1/gp75 y TRP-2 (*Boon y cols, 1997*).

Junto a la expresión de antígenos tumorales ya referida, el melanoma es capaz de expresar moléculas HLA, tanto de clase I como II, y puede ser infiltrado por células T CD8⁺ y CD4⁺ (*Robbins y Kawakami, 1996*), por lo que es susceptible a la lisis por los CTLs que reconocen péptidos derivados de distintos antígenos específicos de melanoma asociados a HLA. Además, las células de melanoma son susceptibles a la lisis no restringida por el MHC, por medio de las células NK, monocitos/macrófagos, y células "asesinas" activadas por linfoquinas (*Velde y Figdor, 1991*). Aunque se dispone de datos que indican la presencia de linfocitos T, macrófagos y células NK en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor (*Bröcker y cols, 1988*), existe controversia en cuanto a la función desempeñada por estas familias de leucocitos y sus subpoblaciones.

En cuanto a la respuesta humoral, en el suero de pacientes con melanoma se han demostrado anticuerpos reactivos contra componentes citoplásmicos, nucleares o de superficie de las células de melanoma (*Thomas y cols, 1983*).

A pesar de la respuesta inmunitaria desencadenada por el melanoma, los casos en que dicha respuesta es capaz de erradicar un tumor establecido son limitados, debido a que las células malignas disponen de mecanismos de escape de la vigilancia inmunológica (*Geertsen y cols, 1999*). El escape de la inmunovigilancia por parte de los tumores, incluido el melanoma, es el resultado

de eventos moleculares dentro de la compleja interacción entre las células del tumor y los linfocitos reactivos y otros componentes del sistema inmunitario (Nawrocki y Mackiewicz, 1999). Algunos mecanismos de escape son más dependientes de la célula tumoral, como:

- Crecimiento de clones de células tumorales no antigénicas (no reconocidas por las células T).
- Expresión inadecuada en las células malignas de HLA o de moléculas coestimuladoras, de adhesión o mediadoras de apoptosis.
- Secreción de moléculas inhibitorias de la respuesta inmunitaria, como IL-10, TGF β , prostaglandina E2 o neuropéptidos inhibitorios.

Otras causas del escape de la célula tumoral a la inmunovigilancia son debidas a fallos propios del sistema inmunitario, como:

- Defectos en la maquinaria encargada del procesamiento de los antígenos tumorales.
- Fallos en la respuesta citotóxica debidos a una disminución en el número o la función de las células T y/o NK, y/o en las APCs.

Diversos estudios han demostrado la pérdida de HLA clase I en el melanoma (Rivoltini y cols, 1995; Garrido y cols, 1997), lo cual se correlaciona con un mal pronóstico (Van Duinen y cols, 1988). Sobre esta base, se ha especulado que la progresión tumoral y la capacidad metastásica pueden favorecerse por la pérdida del reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T citotóxicos, lo cual podría verse reflejado en un infiltrado inflamatorio peritumoral mínimo o ausente. Sin embargo, estos hallazgos deben ser interpretados con precaución, dado que la intensidad de tinción inmunohistoquímica es un parámetro subjetivo difícil de estandarizar. Además, hay que tener en cuenta que el análisis de líneas celulares establecidas de melanoma, cultivadas *in vitro* con múltiples pases en ausencia de presión inmunológica, podría no ser representativo del patrón de expresión de moléculas HLA sobre células neoplásicas *in vivo*.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

En general, el curso clínico de un tumor está influenciado por la interacción entre las células tumorales y el sistema inmunitario del huésped portador del tumor. El melanoma maligno es uno de los tumores más inmunogénicos, caracterizado por una serie de antígenos asociados y una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T específicos. Por tanto, es el arquetipo de tumor donde la intervención sobre el sistema inmunológico podría aplicarse en beneficio del paciente en la práctica clínica. No obstante, las respuestas inmunitarias pueden ser insuficientes para erradicar todas las células malignas, y el melanoma, como otros tumores, puede escapar a los mecanismos de vigilancia inmunológica. Dicho escape es el resultado de una serie de alteraciones, entre las cuales destacan, la pérdida o disminución de moléculas HLA en la superficie del tumor, alteraciones en la expresión de los antígenos asociados al tumor, o deficiencias en el sistema de procesamiento y presentación de dichos antígenos.

Sin embargo, no hay que olvidar que puede existir un estado asociado de inmunosupresión en el huésped portador del tumor que limite la capacidad de respuesta antitumoral. En el control de esta respuesta, pueden ser de suma importancia hechos adicionales como, las variaciones en el repertorio de linfocitos T y B, la expresión de moléculas coestimuladoras o de adhesión y la influencia de diversas citoquinas. Hasta ahora, la mayoría de trabajos para estudiar este aspecto han comportado el uso de experimentos *in vitro* que, aún siendo muy informativos, pueden no ser reflejo exacto de lo que sucede *in vivo*. Por ello puede resultar interesante estudiar la evolución y el comportamiento de parámetros relevantes en el funcionamiento del sistema inmunológico del individuo, como puede ser la distribución de ciertas poblaciones celulares en sangre periférica y los niveles de distintas citoquinas en suero, además de la determinación de factores genéticos que puedan condicionar la capacidad de producción de dichas citoquinas.

Resulta concebible que, si uno o más de los mencionados factores se modifica con la enfermedad, podría ser considerado como un marcador con valor pronóstico, capaz de identificar pacientes con distinta capacidad de respuesta a diferentes estrategias terapéuticas, y servir de base para el desarrollo de nuevas modalidades de tratamientos inmunorreguladores. Además, podría aportar una información precoz para la indicación del tratamiento, y se contaría con la ventaja fundamental de que su medición es sencilla.

La medición de estos marcadores podría, en un futuro no muy lejano, ser aprovechable para controlar el efecto de la inmunoterapia u otros tratamientos, con criterios más funcionales y adaptados a cada paciente de manera individualizada y, en función de su distinta cinética, servir de ayuda para detectar fallos terapéuticos y la necesidad de un tratamiento alternativo.

Además, si se demuestra que la monitorización de ciertos marcadores biológicos es útil en la definición del pronóstico y evolución del melanoma, se puede pensar en su aplicación para establecer una nueva o más completa clasificación de los enfermos con melanoma.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Analizar la relevancia que determinadas características clínicas o histológicas de los melanomas pueden tener sobre la evolución de la enfermedad.

2. Monitorizar en sangre periférica de pacientes con melanoma la evolución de distintas subpoblaciones de células mononucleares que pueden orientar sobre la eficiencia de la respuesta inmunitaria frente al tumor. Investigar si las diferencias en la expresión sobre dichas células de moléculas implicadas en la transmisión de segundas señales, como CD28/CTLA-4, CD80/CD86, CD95 y CD40, pueden relacionarse con el curso de la enfermedad.

3. Analizar las diferencias basales y evolutivas de los niveles séricos de citoquinas representativas de los fenotipos Th1 (INF γ e IL-15) y Th2 (IL-6 e IL-10) en enfermos con melanoma, para valorar si dichos cambios pueden traducir modificaciones en la respuesta inmunitaria que puedan relacionarse con la evolución del tumor.

4. Investigar el polimorfismo de los genes reguladores de citoquinas para los que ha sido establecida la existencia de mutaciones en puntos clave, como es el caso de IL-6, IL-10 e INF- γ , con el fin de tratar de aproximar si algunos genotipos o fenotipos pueden condicionar el tipo de respuesta inmunitaria frente al melanoma.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES

1.1. Selección y control de pacientes

Los pacientes estudiados procedían de las consultas externas de la Sección de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, de Murcia, y fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:

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:

- Metástasis de melanoma en el inicio del estudio.
- Presencia o antecedente de otros tumores malignos.
- Inmunodeficiencia o tratamiento inmunosupresor.
- Enfermedad autoinmune.
- Enfermedad inflamatoria o infecciosa de carácter crónico.

Inicialmente, se incluyeron 35 pacientes de los que visitaron sucesivamente la consulta durante los años 1997 y 1998. Sin embargo, en el análisis final sólo se han considerado 33 pacientes, puesto que uno abandonó el estudio y otro fue retirado tras detectarse un carcinoma de colon durante el periodo de seguimiento.

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.

En todos los casos, el melanoma cutáneo primario fue extirpado con un margen quirúrgico de piel sana variable en función del espesor de Breslow, profundizando cuando era posible hasta fascia muscular, respetando la misma. Cuando la localización anatómica lo permitía, los márgenes de resección de piel sana perilesional fueron de 1 a 2 cm en el caso de los melanomas de menos de 4 mm de espesor de Breslow, y de 3 cm si el tumor tenía mayor índice de Breslow.

En 10 de los 33 pacientes se realizó biopsia selectiva del ganglio centinela, tras inyección de ^{99}Tc (tecnecio) nanocoloide perilesional o alrededor de la cicatriz de la biopsia excisional. El estudio histopatológico se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. En todos los casos estudiados se descartó infiltración maligna de dicho ganglio.

Las visitas de seguimiento se realizaron trimestralmente, e incluían exploración física completa, hemograma y bioquímica general. Además, los pacientes se realizaban anualmente una radiografía simple de tórax y una ecografía hepática. Dependiendo de la sintomatología del enfermo y los resultados de las pruebas complementarias rutinarias, se solicitaron otras técnicas adicionales de diagnóstico, como tomografía axial computarizada, gammagrafía ósea, tránsito gastrointestinal y/o endoscopia digestiva.

Las pruebas de evolución inmunológica, uno de los objetivos fundamentales de esta tesis, requirieron la obtención de muestras de sangre periférica de manera cronológica dentro del periodo total de seguimiento de los pacientes. La primera muestra se recogió en el momento de inclusión de los pacientes en el estudio (muestra basal o tiempo 0). Con posterioridad se tomaron muestras cada 6 meses hasta conseguir un total de 4 muestras por cada paciente (la última obtenida a los 18 meses de su inclusión en el estudio).

Tras concluir el periodo de obtención de muestras, todos los pacientes se mantuvieron en observación clínica durante 12 meses adicionales, de modo que el periodo total de seguimiento fue de 30 meses.

1.2. Variables analizadas

En cada paciente se consideraron una serie de variables clínicas e histológicas, que se describirán a continuación con mayor detalle. Estas variables contribuyeron a la descripción clínica de los pacientes y a la definición de las

características clínicas o histológicas del tumor. Algunas de estas variables fueron utilizadas para la clasificación de los pacientes en distintos grupos de estudio. Ese fue el caso de la edad y el sexo del paciente, y del espesor del melanoma, la supervivencia a los 30 meses del diagnóstico y la aparición de metástasis durante el periodo de seguimiento. Una vez establecidos dichos grupos de estudio, sobre ellos se evaluaron las posibles diferencias o cambios en las distintas variables inmunológicas analizadas.

1.2.1. Variables clínicas

Entre las variables clínicas se consideraron las siguientes:

a) *Extensión de la enfermedad*: aparición de metástasis durante el período de seguimiento:

- No metástasis.
- Metástasis regionales cutáneas o linfáticas.
- Metástasis viscerales.

b) *Supervivencia*: se consideró la muerte o fallecimiento durante el período de seguimiento:

- Vivo.
- Fallecido.

c) *Edad*: se tuvo en cuenta la que tenía el paciente en el momento de la primera visita:

- Menor de 40 años (< 40).
- Mayor o igual a 40 años (≥ 40).

d) *Sexo*:

- Hombre.
- Mujer.

e) *Localización del tumor*:

- Cabeza y cuello.

- Extremidades superiores.
- Tronco.
- Extremidades inferiores.
- Acral.

1.2.2. Variables histológicas:

En cuanto a la descripción histopatológica de los melanomas, se seleccionaron los siguientes parámetros:

a) Espesor de Breslow

Por una parte, para describir el espesor de los melanomas, se ha utilizado la última clasificación propuesta por la AJCC:

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

No obstante, a la hora de analizar los datos relativos a los estudios inmunológicos, pareció más operativo agrupar los melanomas en sólo dos grupos de espesor:

- Espesor menor o igual a 2 mm (≤ 2 mm).
- Más de 2 mm de espesor (> 2 mm).

b) Tipo histológico:

- Melanoma de extensión superficial (MES).
- Melanoma nodular (MN).
- Melanoma lentiginoso acral (MLA).
- Léntigo maligno melanoma (LMM).

c) Ulceración de la superficie tumoral:

- Sí.
- No.

d) Infiltrado inflamatorio:

- Nulo.
- Escaso.
- Intenso.

El infiltrado inflamatorio linfocitario peritumoral se definió como intenso cuando se disponía en banda y con un espesor superior a 0,5 mm, en la base de la lesión; escaso, cuando estaba constituido por focos linfocitarios próximos a la lesión, con espesor inferior a 0,5 mm; y nulo, cuando como mucho se reducía a focos aislados en la periferia de la lesión.

e) Signos de regresión:

- Sí.
- No.

1.2.3. Variables inmunológicas

Para valorar la capacidad de respuesta inmunitaria de los pacientes, se estudiaron tres aspectos principales:

a) Poblaciones y subpoblaciones celulares de sangre periférica.

Para un aprovechamiento máximo de las muestras de sangre periférica, se preparó un protocolo de marcaje con anticuerpos monoclonales (AcMo), cuyo método se detalla más adelante (apartado 3.2.). Dicho método permitía analizar diferentes células de estirpe leucocitaria y valorar la expresión de moléculas constitutivas o que se pueden inducir en los distintos subtipos celulares.

b) Citoquinas en suero.

Se estudiaron cuatro tipos de citoquinas determinadas mediante técnicas de enzoinmunoanálisis (ELISA): $INF\gamma$ e IL-15, como representativas del fenotipo Th1, e IL-6 e IL-10, del fenotipo Th2. Los reactivos utilizados se recogen en las tablas III y IV.

c) *Polimorfismo en los genes reguladores de la secreción de citoquinas.*

Para ello se evaluaron las diferencias puntuales en las regiones promotora o intrónica, según los casos, de los genes que codifican las citoquinas IL-6, IL-10 e INF γ .

1.3. Grupos de estudio

Se analizaron las diferencias existentes para las distintas poblaciones y subpoblaciones celulares en sangre periférica y para las citoquinas séricas seleccionadas, así como los polimorfismos de los genes reguladores de la secreción de determinadas citoquinas. Para dicho análisis se agruparon los pacientes de acuerdo a tres criterios fundamentales:

- a) Espesor de Breslow del melanoma
 - ≤ 2 mm.
 - > 2 mm.

- b) Supervivencia tras el periodo de seguimiento:
 - Vivo.
 - Fallecido.

- c) Aparición de metástasis durante el periodo de seguimiento:
 - No metástasis (**grupo NM**).
 - Metástasis regionales (**grupo MR**).
 - Metástasis viscerales (**grupo MV**).

Cuando en un mismo enfermo aparecieron metástasis regionales y viscerales, el paciente se incluyó en el grupo MV.

Adicionalmente se estudiaron las posibles diferencias debidas al sexo o a la edad del paciente. En este último caso, se consideraron los dos grupos definidos en el apartado de variables clínicas, es decir, sujetos menores de 40 años y de edad igual o superior a 40 años.

Cuando se realizó el análisis de los valores absolutos de las distintas poblaciones celulares o de los niveles de citoquinas, se estudiaron primero las

diferencias intergrupo en cuanto a los **datos basales**. En segundo lugar, se analizaron las diferencias intergrupo e intragrupo de los distintos valores obtenidos durante el periodo de seguimiento; es lo que se ha denominado, en este trabajo, diferencias en los valores globales o **cambios globales**.

2. MATERIAL GENERAL

2.1. Instrumental

Agitador de tubos VX 100 (Labnet International Inc, Woodbridge, NJ, USA)

Cámara de flujo laminar (Telstar S.A., Tarrasa).

Cámara de Neubauer (Exacta, Alemania).

Centrifuga Megafuge 2.0R (Heraeus Instruments, Alemania).

Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Contador automático de leucocitos T-540 (Coulter, Northwell Drive, Reino Unido).

Equipo de ELISA (ADIL instruments, Strasbourg, Francia).

Espectrofotómetro (Whittaker, Austria).

Microscopio óptico (Leitz, Wetzlar, Alemania).

Tanque de nitrógeno líquido (Air-Liquide, Francia).

Termociclador (Perkin-Elmer-Cetus, USA).

2.2. Material fungible

Tubos de vidrio con EDTA, tipo Wintrobe (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Tubos de vidrio heparinizados (Becton Dickinson).

Tubos de vidrio no heparinizados (Becton Dickinson).

Ampollas de congelación de 2 mL (Greiner, Alemania).

Pipetas desechables estériles de diferentes volúmenes (LP Italiana SPa, Milán, Italia).

Placas de 96 pocillos con fondo redondo (Greiner).

Tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson).

Placas especiales para técnicas de ELISA (NUNC, Roskilde, Dinamarca).

Tubos Eppendorf (Hucoa-Erlöss, Madrid).

2.3. Reactivos y soluciones

H₂SO₄ (Panreac, Barcelona).

Tween-20 (Sigma-Aldrich Química, Madrid).

2,2'-Azino-bis(ácido etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma, St. Louis, USA).

AcMo y estándares recombinantes, empleados en las técnicas de ELISA (ver tablas III y IV).

Avidina-peroxidasa (Sigma).

BSA (Sigma).

Estreptavidina-POD-conjugada (Böehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania).

Trizma base (Sigma)

HCl concentrado (Merck, Darmstadt, Alemania)

MgCl₂ 1M (Merck)

KCl (Merck)

Sacarosa (Merck)

Proteínasa K (Böehringer Mannheim)

Triton (Sigma)

Gelatina (Merck)

NP-40 (Fluka, Madrid)

Ácido bórico 89 mM (Sigma)

Taq ADN polimerasa (Böehringer Mannheim)

Agarosa (Sigma)

Suero fisiológico MEIN estéril (Fresenius Kabi España, Barcelona)

PBS (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)

Tampón NaHCO₃ 0,1M (Merck).

Tampón citrato-1, ácido cítrico anhidro 0,1M (Merck).

Agua bidestilada (B. Braun Medical, Rubí, Barcelona)

Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, Trizma base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM (Sigma).

Solución de bromuro de etidio 50 µg/mL (Sigma).

TABLA III. Anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados para cuantificar IL-10 e IFN γ por ELISA.

AcMo / CITOQUINA	CLON	PROVEEDOR	DISPONIBILIDAD
Mouse anti-human-IL10	JES3-9D7	Pharmingen	Purificado
Mouse anti-human-IL10	JES3-12G8	Pharmingen	Biotinilado
IL-10 humana	----	Pharmingen	Recombinante
Mouse anti-human-IFN γ	NIB42	Pharmingen	Purificado
Mouse anti-human-IFN γ	4S.B3	Pharmingen	Biotinilado
IFN γ humano	----	Pharmingen	Recombinante

TABLA IV. Reactivos usados para cuantificar IL-6 e IL-15 por ELISA.

CITOQUINA	PROVEEDOR	LÍMITE DETECCIÓN
IL-6	CLB (Pelikine compact®), Amsterdam, Holanda	0,2 pg/mL
IL-15	R&D Systems Europe (Quantikine®), Abingdon, UK	1 pg/mL

2.4. Anticuerpos monoclonales y reactivos especiales usados en citometría de flujo

Los AcMo utilizados, se recogen en la tabla V, en la cual también se indica el clon de origen, el proveedor y el tipo de fluorocromo con que se han conjugado. Los cuatro fluorocromos usados fueron fluoresceína isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina (PerCP) y alofocianina (APC), todos excitables a una longitud de onda de 488 nm (luz azul) con la ventaja de que emiten a distintas longitudes de onda: 519 nm (luz verde) para FITC, 578 nm (luz naranja) para PE, 660 nm (luz roja) para APC y 675 nm (luz roja) para PerCP.

Solución tamponada de fosfato (PBS, BioMérieux, Marci l'Etoile, France).

Se emplea para mantener el equilibrio osmótico durante el proceso de lavado de sangre y células de cultivo.

Solución de lisado, FACS Lysing Solution (Becton Dickinson).

Esta solución lisa los hematíes y fija simultáneamente los leucocitos, después de haber sido teñidos con los AcMo adecuados.

Solución de lavado, FACS Flow Solution (Becton Dickinson), utilizada en el proceso de adquisición de las muestras para su análisis citométrico.

2.5. Preparación de soluciones y tampones para el estudio del polimorfismo de citoquinas

2.5.1. Soluciones madre

MgCl₂ 1M.

Se disolvieron 101,65 g de MgCl₂ en agua bidestilada (203,3 g/mol) hasta alcanzar un volumen hasta 500 mL. Dicha solución se autoclavó y almacenó a 4°C.

Solución de proteinasa K.

El contenido de un vial de 100 mg de proteinasa K se disolvió en 10 mL de agua bidestilada estéril (10 mg/mL), tras lo cual se prepararon alícuotas de 50 µL en tubos Eppendorff de 0,6 mL previamente autoclavados. Dichas alícuotas se almacenaron a -20°C.

Solución de bromuro de etidio 50 µg/mL

2.5.2. Soluciones tampón

Tampón de lisis.

Se usa para lisar los hematíes contenidos en las muestras de sangre periférica. Para el mismo se preparó una mezcla conteniendo:

- Sacarosa 0,32 M
- Tris-HCl 10 mM pH 7,5
- MgCl₂ 5 mM

- *Triton 1%.*

En la mezcla se usaron 10,9 g de sacarosa, 1 mL de Tris-HCl 1 M, 500 μ L de $MgCl_2$ 1 M, 1 mL de Triton en un volumen final de 100 mL con agua destilada. El tampón de lisis se autoclavó y posteriormente se conservó a 4°C hasta nuevo uso.

Tampón para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utiliza para romper la membrana celular. Es una solución 50 mM en KCl, 10 mM en Tris-HCl pH 8,3 y 2,5 mM en $MgCl_2$, que contenía 0,1 mg/mL de gelatina, Tween-20 al 0,45% y NP-40 al 0,45%. Para 500 mL, se mezclaron: 5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,3; 1,86 g de KCl; 0,254 g de $MgCl_2$; 50 mg de gelatina; 2250 μ L de NP-40 y 2250 μ L de Tween 20. La mezcla se sometió a esterilización en autoclave antes de su uso y en estas condiciones se adicionaron 0,6 μ L de 10 mg/mL de proteinasa K por cada 100 μ L de solución. Si no se iba a usar inmediatamente se conservaba a -20°C.

2.5.3. Soluciones de trabajo

Tris-HCl 1M pH 7,5 y pH 8,3.

Se utilizó Trizma base a una concentración de 121,1 g/mol disuelto en 900 mL de agua bidestilada, ajustando el pH mediante adición de HCl concentrado hasta 7,5 y 8,3, respectivamente. Posteriormente se completó el volumen a 1000 mL con agua bidestilada y la muestra esterilizada en autoclave se almacenó a 4°C hasta su uso.

Solución de TBE 0,5X, Trizma base 44,5 mM, ácido bórico 49,5 mM y EDTA 1 mM.

Para 1000 mL, se toman 500 mL de solución 1X de TBE y se adiciona agua bidestilada hasta completar dicho volumen.

TABLA V. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio de citometría de flujo.

ANTÍGENO	CELS. MARCADAS	CLON	PROVEEDOR	FLUOROCROMO
Distribución leucocitaria amplia				
CD45	Panleucocitario	2D1	BD	PerCP
HLA-I	Todos los leucocitos	W6/32	Serotec	PE, FITC
HLA-DR	Céls B, Céls T-activadas, monocitos	L-243	BD	PE
CD95	Céls B, T y NK, granulocitos, monocitos, timocitos	DX2	Pharmingen	FITC
Linfocitos T				
CD3	Todas las céls T	SK7	BD	PerCP, APC
CD4	Céls T, monocitos	SK3	BD	APC
CD5	Céls T	UCHT2	Pharmingen	APC
CD8	Céls T y NK	SK1	BD	PerCP
CD95L	Céls T activadas	NOK1	Pharmingen	PE *
Linfocitos B				
CD19	Todas las céls B	4G7	BD	APC, PerCP
Células NK				
CD16	Céls B, T y NK, monocitos	NKP15	BD	FITC
CD56	Céls T y NK	NCAM16.2	BD	FITC
Monocitos				
CD14	Monocitos, granulocitos	MØP9	BD	APC
Moléculas de adhesión, coestimulación y activación				
CD40	Monocitos, céls B	5C3	Pharmingen	FITC
CD40L	Céls T	TRAP1	Pharmingen	PE
CD80	Céls B y T, monocitos	L307.4	Pharmingen	FITC
CD86	Céls B y T, monocitos	IT2.2	Pharmingen	PE
CD28	Céls T	CD28.2	Inmunotech	FITC
CTLA-4	Céls T	BNI3	Pharmingen	PE

* Marcaje indirecto de CD95L-biotina con estreptavidina-PE.

Abreviaturas: Céls., células; CD, *cluster* de diferenciación; NK, *natural killer*, BD, Becton Dickinson.

Proveedores: BD (Mountain View, CA, USA), Immunotech (Marseille, France), Pharmingen (San Diego, USA), Serotec (Oxford, Reino Unido).

3. MÉTODOS

3.1. Protocolo de extracción y recogida de muestras

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas mediante punción venosa y en condiciones de esterilidad. Se extrajo una primera muestra al inicio del estudio y, durante el periodo de seguimiento, se repitieron las extracciones cada seis meses, hasta completar un total de cuatro muestras por paciente. En cada extracción se obtuvieron dos tipos de muestras:

a) *Muestras anticoaguladas*, recogidas en tubos con EDTA, tipo Wintrobe, con los que se recuperaba un volumen de 2 mL de sangre total. Estas muestras, se utilizaban para realizar un hemograma y para el marcaje y estudio mediante citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias. Además, se obtenían muestras en tubos heparinizados, y se utilizaban para separar células mononucleares de sangre periférica, que se congelaban en nitrógeno líquido para crear un archivo de muestras disponible para posibles análisis posteriores. Los elementos formes se separaban mediante gradiente de centrifugación con Lymphoprep® a 680xg durante 25 minutos, tras lo cual se sometieron a 3 lavados con suero salino y centrifugación a 355xg, eliminando los sobrenadantes por aspiración al vacío. Se empleó Azul Tripán para analizar la viabilidad celular y contar las células en cámara de Neubauer por observación directa al microscopio óptico. El plasma remanente de cada tubo se alicuotó en tubos de 1,8 cc y se congeló a -70°C.

b) *Muestras no anticoaguladas* para la obtención de sueros, recogidas en tubos de vidrio no heparinizados, que se mantenían a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo, tras lo cual se centrifugaban durante 10 minutos a 840xg. El suero, así obtenido era alicuotado en dos tubos y congelado a -70 °C.

Todo el proceso seguido para la obtención de células mononucleares, suero y plasma, se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, trabajando en una cámara de flujo laminar de alta seguridad biológica.

3.2. Estudios mediante citometría de flujo

Para estos estudios se dispuso de un citómetro de flujo equipado con láser de argón de 488 nm y diodo rojo de 635 nm, con posibilidad de medir simultáneamente cuatro colores de emisión, lo que permitió detectar diversas combinaciones de marcadores de poblaciones celulares (tabla VI).

3.2.1. Preparación y marcaje de las muestras para la citometría de flujo

En tubos de polipropileno de 10x75 mm, se distribuyeron 100 μ L de sangre total anticoagulada con EDTA y 10 μ L de cada AcMo. Las combinaciones de AcMo que se aplicaron según el protocolo de estudio utilizado para el análisis fluorocitométrico de los distintos subtipos celulares y de la expresión de moléculas de superficie en las células mononucleares, se exponen en la tabla VI. Una vez mezclados homogéneamente, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y ambiente oscuro, y se fijaron con 3 mL de solución de lisis/fijación durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron en centrifuga refrigerada a 4°C durante 5 minutos a 355xg. Tras decantar el sobrenadante, el botón celular del fondo del tubo se agitaba, se lavaba con solución de lavado y se volvía a centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 355xg, repitiendo todo este proceso dos veces seguidas. Por último el botón celular se resuspendía en 0,5 mL de PBS. En todos los casos se procesó en paralelo un tubo con el control de isotipo de inmunoglobulinas para cada uno de los fluorocromos usados en el marcaje.

TABLA VI. *Combinaciones de anticuerpos monoclonales usados en los estudios de citometría de flujo.*

Nº TUBO	FITC	PE	APC	PerCP
1	CD40	HLA-I	CD14	CD45
2	CD16/56	CD40L	CD3	CD8
3	CD28	CTLA-4	CD4	CD8
4	CD80	CD86	CD5	CD19
5	CD95	CD95L	CD19	CD3
6	Controles de isotipo			

3.2.2. Adquisición en el citómetro de las muestras marcadas

Para que la adquisición sea válida y reproducible es preciso que el equipo se estandarice adecuadamente antes de iniciar cualquier proceso de adquisición y análisis de una muestra. Por ello, los componentes fotoeléctricos del citómetro se ajustaron semanalmente utilizando el programa informático "AutoCOMP" y los calibradores CALIBRITES (Becton Dickinson) (microesferas marcadas con fluoresceína -FITC- y ficoeritrina -PE- y sin marcar), usados para minimizar el posible solapamiento entre los distintos espectros de las señales de fluorescencia. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las microesferas marcadas con FITC y PE fue calculada diariamente, y sólo cuando se observaron cambios significativos en sus intensidades de fluorescencia, el citómetro fue recalibrado.

Una vez controlada la calibración, las muestras marcadas se adquirieron en el citómetro usando el programa informático "CellQuest" para la adquisición de datos. Para ello, una vez marcadas, las muestras se diluyeron en PBS, para conseguir una velocidad de adquisición de entre 200-1200 eventos por segundo. Se adquirieron entre 20.000 y 30.000 eventos mediante una ventana adecuada a células linfocitarias. El programa permitía el análisis simultáneo de seis parámetros en las células de las muestras adquiridas: FSC ("*forward scatter*") y SSC ("*side-angle scatter*"), que determinan el tamaño y la complejidad celular respectivamente y, siguen una escala lineal, mientras las distintas fluorescencias, FL1, FL2, FL3 y FL4, siguen una escala logarítmica.

3.2.3. Análisis de los datos de citometría

Para calcular el porcentaje de células que expresaban las moléculas marcadas para su estudio, se utilizó el marcaje para el control de fluorescencias Simultest IgG1-FITC/IgG2a-PE (Becton Dickinson) e IgG1-TRICOLOR (Caltag), mediante el cual se establecieron los límites a partir de los cuales se consideraba positiva la expresión de cada uno de los anticuerpos monoclonales empleados. Los resultados se recogían como porcentaje de linfocitos positivos para una determinada molécula reconocida por su anticuerpo monoclonal específico.

En un análisis simultáneo, se determinó el número de leucocitos totales (células/ μ L) mediante un contador automático (Coulter T-540), que sirvió para

determinar los **valores absolutos** de cada una de las subpoblaciones celulares estudiadas. De este modo, usando los porcentajes estimados por citometría de flujo para cada población y teniendo en cuenta el número total de leucocitos, se pudo calcular el número absoluto de células/ μL para cada subtipo celular.

Cálculo de valores absolutos

Las formulas utilizadas para el calculo de los valores absolutos de poblaciones y sus subtipos fueron respectivamente:

$\begin{array}{l} \text{n}^\circ \text{ de linfocitos,} \\ \text{o monocitos} \\ \text{(por } \mu\text{L de sangre)} \end{array} = \dots \frac{(\text{n}^\circ \text{ leucocitos}/\mu\text{L}) \times (\% \text{ linfocitos o monocitos})}{10^2}$

$\begin{array}{l} \text{n}^\circ \text{ de células de una} \\ \text{subpoblación linfocitaria} \\ \text{(por } \mu\text{L de sangre)} \end{array} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ leucocitos}/\mu\text{L}) \times (\% \text{ linfocitos}) \times (\% \text{ de la subpoblación})}{10^4}$

Cálculo de la Intensidad media de fluorescencia (IFM) para un marcador dado.

La IMF de una molécula en una población celular es proporcional al número de moléculas detectadas sobre la superficie de dichas células, con lo que se ofrece una estimación de la intensidad de expresión de la molécula analizada. El coeficiente de variación (CV) es indicativo del grado de homogeneidad en la expresión o distribución de dicha molécula dentro de la población estudiada. Para su cálculo se usaron los parámetros proporcionados por el programa de análisis PAINT-A-GATE pro, IMF y CV, expresados en valores lineales de 1 a 10.000.

3.3. Cuantificación de citoquinas en suero mediante una técnica de ELISA

El análisis de citoquinas se realizó mediante una técnica convencional de ELISA. En el caso de la IL-10 y el IFN γ , la determinación se realizó mediante un método preparado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen

de la Arrixaca usando, como anticuerpos de captura, AcMo purificados anti-interleuquinas humanas y, para el revelado, AcMo biotinilados que reconocían diferentes epitopes de la interleuquina correspondiente (tabla III). Como estándar se utilizó cada interleuquina en su forma recombinante obtenida comercialmente. Para el análisis de la IL-6 y la IL-15, se usaron métodos comerciales disponibles en el mercado (tabla IV).

3.3.1. Cuantificación de IL-10 e IFN γ

La cuantificación de IL-10 e IFN γ en muestras de suero se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el la empresa suministradora de reactivos con algunas modificaciones, tal como se detalla a continuación.

Fijación del AcMo purificado y bloqueo de las placas.

El AcMo purificado se diluyó a una concentración de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ en tampón bicarbonato y se distribuyeron 50 μL por pocillo. Una vez hecha la dispensación, las placas se incubaron a 4°C en agitador horizontal toda la noche y se lavaron 2 veces con PBS-Tween-20 al 0,05%, con una demora de un minuto entre lavado y lavado. Posteriormente las placas se secaron sobre papel secante, se bloquearon añadiendo 200 μL por pocillo de PBS-BSA 3% y se incubaron durante dos horas en reposo a temperatura ambiente. A continuación se lavaron de nuevo 2 veces con PBS-Tween-0.05%.

Realización del ensayo.

Para construir las curvas patrón se prepararon diluciones seriadas en PBS-BSA-3% de las citoquinas recombinantes humanas: IL-10 (concentración inicial 500 pg/mL y final 7,8 pg/mL) e IFN γ (concentración inicial 500 pg/mL y final 7,8 pg/mL). En cada pocillo se dispensaron 100 μL de cada dilución del estándar y otros 100 μL de cada suero a estudiar sin diluir.

Todos los puntos se analizaron siempre por duplicado, manteniendo los pocillos correspondientes al “blanco” y al “cero” sólo con PBS-BSA-3%. Las

placas se incubaron toda la noche a 4°C en el agitador horizontal, y se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0.05%. A continuación se adicionaron 100 µL por pocillo del anticuerpo monoclonal biotilado específico para cada citoquina diluido a una concentración final de 2,5 µg/mL en PBS-BSA-3%. Tras una incubación de 45 minutos en agitación a temperatura ambiente, las placas se volvieron a lavar 6 veces con PBS-Tween-0.05%, se les añadieron 100 µL por pocillo de avidina-peroxidasa diluida 1:400 en PBS-BSA-3%. A los pocillos del "cero" no se les añadió ni AcMo biotilado ni avidina-peroxidasa, sino que se mantuvieron sólo con PBS-BSA- 3%.

Desarrollo del color y medida.

Después de lavar 8 veces las placas con PBS-Tween al 0,05%, se añadieron 100µL del correspondiente sustrato previamente descongelado, ABTS 0,05 mM en tampón citrato-1 y 0,1% de H₂O₂ (el H₂O₂ se añade al sustrato justo antes de ser utilizado). Las placas se incubaron en agitación y oscuridad hasta que se desarrolló color (45-50 minutos), tras lo cual se leyeron a 405 nm en el espectrofotómetro.

La sensibilidad de cada uno de los ensayos se consideró como el menor cambio en la concentración de citoquina que pudo ser detectado con fiabilidad, y a efectos prácticos, se calculó como el valor mínimo de concentración de citoquina diferente al cero que era posible detectar en la curva estándar en un valor equivalente a 2 desviaciones estándar (límites de confianza del 95%). De esta manera, la sensibilidad estimada para cada uno de los ensayos fue de 7,8 pg/mL para IL-10 e IFN γ .

Para estimar la reproducibilidad de nuestros ensayos, se calculó la variación intraensayo, mediante el cálculo del coeficiente de variación de los valores obtenidos en medidas repetidas (n=20) de la concentración de citoquinas de una mezcla de sueros con concentración conocida, obteniéndose unos resultados de 5,6% y 5,1% para los ensayos de IL-10 e IFN γ , respectivamente. Dicha mezcla se usó además en cada uno de los ensayos realizados para evaluar la variabilidad interensayo, que resultó ser 11,3% y 11,7% para cada uno de los ensayos anteriormente mencionados. El coeficiente de variación de los duplicados

de las muestras, estándares y controles permaneció por debajo del 10% en todos los casos.

3.3.2. Cuantificación de IL-6 e IL-15

En este caso, al ser el método de ELISA de procedencia comercial, se siguieron las indicaciones de cada fabricante (Tabla IV).

3.4. Análisis del polimorfismo de citoquinas

3.4.1. Procedimiento de extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguieron estos pasos:

1. Partiendo del tubo de sangre anticoagulada con EDTA, se tomaron 500 μ L de sangre total en un tubo Eppendorff de 1,6 mL y se mezclaron con 500 μ L de tampón de lisis. La mezcla se centrifugó a 3700xg durante unos 20 segundos. Tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 1 mL de tampón de lisis. Cuando no se obtuvo una lisis total en el primer paso, el proceso se repitió tantas veces como fuera necesario hasta que el sobrenadante fuera transparente.
2. Seguidamente, el botón celular resultante se resuspendió en 500 μ L de tampón para PCR y se transfirió a otro tubo Eppendorff de 0,6 mL, añadiendo 3 μ L de proteinasa K y agitando bien. Esta mezcla se incubó a 50-60°C durante 1 hora. Posteriormente, todas las muestras se calentaron a 95°C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K.
3. De la preparación anterior, se utilizaron 15 μ L para cada amplificación o se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se sabe que aproximadamente 25 μ L del lisado equivalen a 1 μ g de ADN genómico. No obstante, en todos los casos se cuantificó la densidad óptica (DO) a 260 nm.

3.4.2. Análisis por PCR mediante cebadores específicos de secuencia

a) Procedimiento de amplificación.

Se utilizó una técnica preparada comercialmente (One Lambda, Los Angeles, CA, USA), siguiendo el protocolo recomendado y utilizando:

- *Solución de amplificación (PCR→ D-mix)*, preparada por la casa comercial y que contiene: tampón para PCR, mezcla de desoxinucleótidos, glicerol y colorante de marcado del recorrido.
- *ADN problema*, a una concentración comprendida entre 50-100 µg/mL.
- *Taq ADN polimerasa*, a una concentración de 5 UI/µL.

Se siguieron los pasos que se indican a continuación:

1. Descongelar los reactivos y la placa que contiene los cebadores. Mezclar y agitar el ADN y la solución D-mix mediante la ayuda de un vortex. Aplicar la placa de cebadores sobre la gradilla o soporte del termociclador. Añadir con pipeta de desplazamiento positivo 1 µL de agua destilada estéril al tubo control negativo (posición H de la placa). Este tubo debe contener sólo una mezcla de todos los reactivos con excepción del ADN problema, en lugar del cual se añade un volumen equivalente de agua bidestilada.
2. Añadir 2 µL de Taq ADN polimerasa a cada tubo, agitar durante 5 segundos y centrifugar a baja velocidad.
3. Añadir 9 µL de la mezcla al tubo del control negativo y 39 µL de ADN al resto de tubos. Agitar y centrifugar de nuevo. Dispensar 10 µL de esta mezcla en cada pocillo de la placa de PCR, excepto en el control negativo. Tapar los tubos con tapones o con papel adhesivo suministrado por la casa comercial; en este último caso, colocar encima la almohadilla termorresistente.
4. Transportar la placa al área de post-amplificación y colocar la gradilla en el termociclador. Se utiliza el programa numerado como 90, durante un tiempo aproximado de 1,2 horas (tabla VII).

TABLA VII. Esquema de ciclos, temperatura y tiempo usados en el termociclador durante el proceso de amplificación del ADN.

NÚMERO DE CICLOS	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
1	1	4	

b) Visualización del producto amplificado

Se efectuó electroforesis del amplificado como se explica a continuación:

1. Se preparó un gel de agarosa al 2,5%, conteniendo 0,75 g de agarosa en 30 mL de tampón TBE 0,5X. Tras agitar suavemente, se colocó en un microondas durante 3-5 minutos hasta que el gel quedó transparente. Después, se enfrió hasta 60°C, agitando de vez en cuando para conseguir un enfriamiento uniforme y evitar que la agarosa polimerice por unas zonas ántes que por otras.
2. Una vez que el gel estuvo preparado, se añadieron 10 mL de TBE 0,5X y 3 μ L de bromuro de etidio comprobando que todos los pocillos estuvieran llenos.
3. Se transfirieron 10 μ L del amplificado completo a cada pocillo del gel sumergido en la cubeta de la electroforesis con tampón TBE 0,5X, mediante un sistema de transferencia en bloque. Se colocó la cabecera de los electrodos sobre el gel, y se conectaron del polo negativo al positivo. Se mantuvo el recorrido durante unos 4 minutos a 140 V, comprobando que el colorante migrara aproximadamente 0,5 cm.
4. Se desconectó la fuente y se llevó el gel al transiluminador de luz UV para visulizar los fragmentos de ADN y obtener una foto.

3.5. Métodos estadísticos

Se realizó una estadística descriptiva de variables clínicas e histológicas, obteniendo su distribución de frecuencias.

Para los valores absolutos de las poblaciones celulares y citoquinas en los distintos grupos de pacientes, se calcularon los parámetros descriptivos: media, error de la media, desviación típica y varianza.

La comparación de los datos basales referidos a las poblaciones celulares y citoquinas, se llevó a cabo mediante el test de Mann-Whitney, prueba no paramétrica para muestras independientes.

El análisis de la evolución de las variables inmunológicas se hizo aplicando un análisis de varianza de medidas repetidas relativo a un diseño factorial jerarquizado. Cuando dicho análisis de varianza reveló que existían diferencias entre un número de grupos de pacientes superior a dos, caso de las metástasis, se utilizó la prueba de Bonferroni, que utiliza pruebas t para realizar comparaciones por pares entre las medias de los grupos.

La relación entre variables cualitativas se contrastó mediante análisis de tablas de contingencia con el test de la χ^2 de Pearson, aplicando la corrección de Yates, o utilizando el test exacto de Fisher cuando el número de casos fue insuficiente.

IV. RESULTADOS

Se expondrán en primer lugar algunas características clínicas de los pacientes y determinados rasgos histológicos de los melanomas estudiados. Algunos de estos parámetros clínicos e histológicos han servido de base para establecer los grupos de pacientes sobre los que se compararán los resultados inmunológicos.

1. DATOS CLINICOS

1.1. Edad

La edad media de los enfermos en el momento de su inclusión en el estudio fue de 55,8 años (rango: 35-74 años). La mayor parte de los pacientes tenían una edad igual o superior a 40 años (tabla VIII).

1.2. Sexo

El número de pacientes de sexo femenino y masculino fue aproximadamente el mismo (tabla VIII).

1.3. Localización del tumor

En la serie estudiada, los melanomas se localizaron con mayor frecuencia en las extremidades inferiores, seguidas, en orden decreciente, por el tronco, cabeza y cuello, región acral y, por último, las extremidades superiores (tabla IX). De los cinco melanomas acrales (palmo-plantares y subungueales), cuatro se localizaban en las extremidades inferiores y uno en las superiores.

En cuanto a la distribución anatómica según el sexo, la localización más frecuente en mujeres fueron las extremidades inferiores (58,8%), y el tronco en los hombres (37,5%).

Los melanomas localizados en el tronco y los acrales tenían mayor espesor, mientras que los más delgados eran los que afectaban las extremidades (tabla IX).

1.4. Desarrollo de metástasis

A los 30 meses del inicio del estudio, aproximadamente la cuarta parte de los enfermos habían presentado metástasis de melanoma. De acuerdo a la aparición o no de metástasis, y a su localización, los pacientes se clasificaron en tres grupos: a) sin metástasis (grupo **NM**); b) con metástasis regionales (grupo **MR**), que incluía un paciente con afectación ganglionar y otros tres enfermos con metástasis cutáneas en tránsito; y c) con metástasis viscerales (grupo **MV**), constituido por cinco pacientes, dos de los cuales mostraron previamente afectación ganglionar. El tiempo medio hasta la aparición de metástasis viscerales en el grupo MV fue de $14,65 \pm 6,30$ meses (rango: 6,1 - 19,7 meses).

1.5. Supervivencia y su correlación con otras variables clínicas.

Tras 30 meses de seguimiento, 29 pacientes (87,9%) permanecían vivos, y el resto (12,1%) había fallecido por el melanoma. El tiempo medio hasta el fallecimiento fue de $26,37 \pm 2,88$ meses (rango: 22,6 - 29,6 meses).

TABLA VIII. Supervivencia tras el período de seguimiento, agrupando los enfermos según el sexo, la edad y la localización anatómica del melanoma primario.

SUPERVIVENCIA	SEXO		EDAD (años)		
	Hombre n=16 (48,5%)	Mujer n=17 (51,5%)	<40 n=7 (21,2%)	≥40 n=26 (78,8%)	
Vivo	13 (81,3%)	16 (94,1%)	7 (100%)	22 (84,6%)	
Fallecido	3 (18,8%)	1 (5,9%)	0 (0%)	4 (15,4%)	
Total	16 (100%)	17 (100%)	7 (100%)	26 (100%)	
LOCALIZACIÓN					
	Cabeza y cuello	EESS	Tronco	EEII	Acral
Vivo	3 (60%)	2 (100%)	6 (85,7%)	14 (100%)	4 (80%)
Fallecido	2 (40%)	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	1 (20%)
Total	5 (100%)	2 (100%)	7 (100%)	14 (100%)	5 (100%)

TABLA IX. Distribución anatómica de los melanomas y espesor medio según su localización.

LOCALIZACIÓN	n	%	ESPESOR (mm)
Cabeza/cuello	5	15,2	2,32 ± 1,70
Tronco	7	21,2	3,42 ± 1,75
Miembro inferior	14	42,4	1,38 ± 1,19
Miembro superior	2	6,1	0,80 ± 0,42
Acral	5	15,2	3,11 ± 2,01
Total	33	100,0	2,18 ± 1,75

2. DATOS HISTOLÓGICOS

2.1. Espesor de Breslow

El espesor medio de los melanomas de este estudio fue de $2,18 \pm 1,75$ mm (rango: 0,20 - 6,70 mm). Los tumores de menos de 1 mm de espesor fueron los

más frecuentes, aunque la incidencia de los melanomas de 2,01 a 4 mm de grosor estuvo muy próxima a la de aquéllos (tabla X).

TABLA X. Distribución de los melanomas estudiados en función del espesor de Breslow.

ESPESOR (mm)	n	%
< 1	12	36,4
1,01-2	6	18,2
2,01-4	11	33,3
> 4	4	12,1
Total	33	100,0

La (tabla XI) resume el valor medio del espesor de Breslow en relación con la edad, el sexo, la supervivencia y el desarrollo de metástasis. Dicho valor fue mayor en los hombres, en los sujetos mayores de 40 años, en los que fallecieron y en los que desarrollaron metástasis viscerales.

TABLA XI. Valores medios de espesor de Breslow en función del sexo, edad, supervivencia o aparición de metástasis.

	EDAD (años)		SEXO		
	<40	≥40	Hombre	Mujer	
Espe- sor (mm)	1,87 ± 2,24 (0,20-5,50)	2,26 ± 1,60 (0,20-6,70)	2,70 ± 1,91 (0,20-6,70)	1,69 ± 1,44 (0,30-5,20)	
	SUPERVIVENCIA		EXTENSIÓN DEL TUMOR		
	Vivo n=29 (87,9%)	Fallecido n=4 (12,1%)	NM n=24 (72,7%)	MR n=4 (12,1%)	MV n=5 (15,2%)
Espe- sor (mm)	1,89 ± 1,57 (0,20-5,50)	4,32 ± 1,58 (2,95-6,70)	1,78 ± 1,54 (0,20-5,20)	1,65 ± 0,48 (1,00-2,30)	4,56 ± 1,48 (2,95-6,70)

NM, no metástasis; MR, metástasis regionales; MV, metástasis viscerales.

2.2. Tipo histológico

El melanoma de extensión superficial (MES) fue el tipo histológico más frecuente (54,5%), seguido en orden decreciente de frecuencia por el melanoma nodular (MN) (27,3%), el melanoma lentiginoso acral (MLA) (15,2%) y, por último, el léntigo maligno melanoma (LMM) (3,0%).

2.3. Ulceración

En la serie de melanomas estudiada, había un claro predominio de las lesiones no ulceradas (n=27; 81,8%) sobre las que evidenciaban ulceración en el análisis histopatológico (n=6; 18,2%).

2.4. Infiltrado inflamatorio

En la mayoría de melanomas, el infiltrado inflamatorio peritumoral fue nulo (42,4%) o escaso (39,4%), mientras que sólo unos pocos tumores mostraban un infiltrado intenso (18,2%).

2.5. Regresión

Se llegaron a demostrar signos histológicos de regresión en cinco melanomas (15,2%), mientras que dichos signos estaban ausentes en el resto de tumores (84,8%).

2.6. Tipo celular

El tipo celular epitelioides mostró la mayor prevalencia (54,5%), seguido, en orden decreciente de frecuencia, por los melanomas con predominio de células atípicas (27,3%), de células fusiformes (15,2%) y, por último, de células nevoides (3%).

2.7. Correlación de variables histológicas con la supervivencia

En cuanto a la relación existente entre determinadas características histopatológicas del tumor y la supervivencia del paciente (tabla XII), a continuación se detallan varias asociaciones significativas y otras que, aunque en esta serie no alcanzaron significación estadística, resultaron llamativas.

En el presente estudio se pudo observar que todos los enfermos que fallecieron a lo largo del periodo de seguimiento, presentaron melanomas de más de 2 mm de espesor de Breslow, con ausencia de infiltrado inflamatorio peritumoral y con predominio de células tumorales atípicas. En este sentido, se demostró una correlación positiva significativa entre el fallecimiento del paciente y tanto el infiltrado nulo ($P=0,02$) como la variante de melanoma con celularidad atípica ($P=0,003$).

El MN fue el tipo histológico que se correlacionó con mayor mortalidad, lo cual resultó significativo ($P=0,03$), seguido por el MLA.

La ulceración histológica se asoció, de modo no significativo, con un menor tiempo de supervivencia que la ausencia de ulceración.

No se produjo el fallecimiento de ningún paciente cuyo melanoma mostró signos de regresión a nivel histológico.

A pesar del interés de las diversas características histológicas de los melanomas estudiados, a la hora de intentar asociarlas con las diversas variables inmunológicas analizadas en los pacientes, no se pudo comprobar ningún tipo de correlación, con excepción del espesor de Breslow mayor o menor de 2 mm. Esto se observó en análisis estadísticos preliminares realizados con los datos

procedentes del estudio de las distintas muestras de sangre obtenidas de los pacientes.

TABLA XII. Supervivencia de los enfermos en función de las características histopatológicas de los melanomas.

SUPERVIVENCIA	TIPO HISTOLÓGICO				
	MES	MN *	MLA	LMM	
Vivo	18 (100%)	6 (66,7%)	4 (80%)	1 (100%)	
Fallecido	0 (0%)	3 (33,3%)	1 (20%)	0 (0%)	
Total	18 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	1 (100%)	
	ESPESOR (mm)		ULCERACIÓN		
	≤ 2	> 2	Si	No	
Vivo	18 (100%)	11 (73,3%)	4 (66,7%)	25 (92,6%)	
Fallecido	0 (0%)	4 (26,7%)	2 (33,3%)	2 (7,4%)	
Total	18 (100%)	15 (100%)	6 (100%)	27 (100%)	
	INFILTRADO			REGRESIÓN	
	Ausente *	Escaso	Intenso	Si	No
Vivo	10 (71,4%)	13 (100%)	6 (100%)	5 (100%)	24 (85,7%)
Fallecido	4 (28,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (14,3%)
Total	14 (100%)	13 (100%)	6 (100%)	5 (100%)	28 (100%)
	TIPO CELULAR				
	Epiteliode	Fusifome	Atípico **	Nevoide	
Vivo	18 (100%)	5 (100%)	5 (55,6%)	1 (100%)	
Fallecido	0 (0%)	0 (0%)	4 (44,4%)	0 (0%)	
Total	18 (100%)	5 (100%)	9 (100%)	1 (100%)	

Grado de significación de la correlación entre la característica histológica señalada y el fallecimiento del paciente: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$

3. ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LOS PACIENTES

Los estudios inmunológicos, de acuerdo al tipo de análisis realizado, se han dividido en tres apartados:

- a) Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica.
- b) Cuantificación de citoquinas en suero.
- c) Estudios del polimorfismo en las regiones reguladoras de los genes de citoquinas.

Los resultados de los estudios inmunológicos correspondientes a los dos primeros apartados se han escindido para exponer por separado:

- a) Las diferencias observadas en las determinaciones **basales** de las poblaciones celulares y citoquinas estudiadas. El fin de este análisis era determinar si existe algún factor inmunológico cuyas modificaciones se manifiesten tan precozmente como para poseer valor pronóstico desde la primera visita del paciente.
- b) Los cambios **globales** experimentados por las distintas poblaciones celulares y citoquinas a lo largo del estudio. En este caso se tendrán en cuenta todas las muestras obtenidas sucesivamente a cada paciente, incluida la muestra inicial o basal.

En el análisis de los datos inmunológicos, para estudiar si podían existir diferencias entre los pacientes en relación con la evolución del proceso tumoral, se agrupó a los enfermos en función del espesor tumoral mayor o menor de 2 mm, de la aparición o no de metástasis y de su tipo (regionales o viscerales), y de la supervivencia o no tras el periodo de seguimiento. Además, se intentó valorar la existencia de posibles sesgos en relación con la diferente edad o el sexo de

los pacientes, consideradas como variables inherentes al individuo y no dependientes de la enfermedad.

Tras agrupar a los pacientes en función del sexo y de la edad mayor o menor de 40 años, se pudo comprobar que las concentraciones basales de las distintas poblaciones celulares estudiadas no experimentaron cambios sustanciales en las sucesivas muestras que se fueron extrayendo a los enfermos. Por este motivo, se consideró que dichos valores basales eran representativos de los valores obtenidos en las muestras posteriores.

3.1. Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica

3.1.1. Diferencias en las determinaciones basales de poblaciones celulares en sangre periférica

En primer lugar se procedió a la cuantificación de los leucocitos, linfocitos y monocitos totales a la llegada del paciente a la consulta. Estas determinaciones también se realizaron en todas las extracciones posteriores, como dato previo para poder calcular los valores absolutos de cada subtipo celular estudiado.

El número absoluto de leucocitos totales, linfocitos y monocitos no mostró diferencias significativas con respecto al espesor del tumor, la supervivencia del paciente o la aparición de metástasis. No obstante, la concentración de estas células era más baja en el grupo de enfermos que fallecieron.

Tampoco se observaron diferencias significativas en los valores basales de leucocitos totales, linfocitos y monocitos en relación con la edad o el sexo del paciente, aunque el número absoluto de monocitos era más elevado en los pacientes mayores de 40 años.

3.1.1.1. Linfocitos T y sus subpoblaciones

En este trabajo, se han considerado como linfocitos T CD4⁺ totales a aquellas células con positividad para el marcador CD3 y negatividad para el CD8, es decir, las células CD3⁺CD8⁻.

En las muestras basales, la concentración de células CD3⁺ totales, CD4⁺ y CD8⁺ era menor en los pacientes que fallecieron posteriormente que en los que sobrevivieron al final del estudio, aunque en ningún caso la diferencia observada fue estadísticamente significativa (tabla XIII). Las diferencias en la concentración basal de estas células en función del espesor tumoral o de la aparición de metástasis eran aún menos evidentes (tabla XIII y XIV). Lógicamente, el estudio aislado del valor basal del cociente CD4⁺/CD8⁺ tampoco aportaba información adicional de interés (ver muestra número 1 en figura 3a y, sobre todo, 3b).

En el momento basal, tanto el número de linfocitos CD3⁺ como CD4⁺ totales era inferior en los pacientes de edad más avanzada que en los más jóvenes ($P=0,011$ y $P=0,002$ respectivamente) (tabla XV). Aunque los linfocitos CD3⁺CD8⁺ también eran menos numerosos en el grupo de pacientes mayores de 40 años, dicha diferencia no llegó a alcanzar significación ($P=0,07$). La influencia del sexo no fue relevante para ninguna de estas poblaciones (tabla XV).

A) Expresión de CD28 y CTLA4 en células CD4⁺ y CD8⁺

En las muestras basales, el número de células CD4⁺CD28⁺ no varió significativamente en relación con las variables no inherentes al individuo (tablas XIII y XIV), si bien disminuyó rozando la significación en los pacientes con melanomas de mayor espesor ($P=0,055$) (figura 4a) y en los que fallecieron ($P=0,061$) (figura 4b).

La concentración basal de células CD4⁺CD28⁺ sí era menor en los pacientes mayores de 40 años que en los más jóvenes ($P<0,0001$), pero no mostró cambios significativos en relación con el sexo (tabla XV).

En el momento basal, se observó un aumento en el número de células CD4⁺CD28⁻, en detrimento de las CD4⁺CD28⁺, en los enfermos con melanomas de mayor espesor, en los que fallecieron y en el grupo MV (en comparación con el grupo NM), aunque ninguna de esas diferencias alcanzó significación estadística. El aumento en las cifras basales de las células CD4⁺CD28⁻ también se detectó en los pacientes de mayor edad, en comparación con los más jóvenes, pero fue todavía menos significativo.

TABLA XIII. Concentración de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺, CTLA4⁺ y CD95⁺ (células/ μ L), con respecto al espesor tumoral (≤ 2 mm vs > 2 mm) y la supervivencia de los pacientes.

	Céls. CD3 ⁺		Céls. CD4 ⁺		Céls. CD8 ⁺	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	1305 \pm 324	1271 \pm 580	866 \pm 284	745 \pm 298	436 \pm 152	512 \pm 301
6 m	1274 \pm 316	1114 \pm 539	830 \pm 254	684 \pm 325	440 \pm 169	429 \pm 244
12 m	1268 \pm 378	1132 \pm 358	829 \pm 237	697 \pm 219	425 \pm 188	426 \pm 181
18 m	1262 \pm 288	1066 \pm 357	832 \pm 210	640 \pm 223	419 \pm 171	430 \pm 170
Total	1277 \pm 322	1146 \pm 464	839 \pm 243	691 \pm 266	430 \pm 167	449 \pm 227
	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos
Basal	1316 \pm 422	1097 \pm 670	831 \pm 283	667 \pm 361	477 \pm 224	426 \pm 313
6 m	1249 \pm 391	862 \pm 625	789 \pm 269	576 \pm 430	454 \pm 194	294 \pm 245
12 m	1194 \pm 352	1293 \pm 536	770 \pm 233	766 \pm 286	414 \pm 169	511 \pm 273
18 m	1189 \pm 324	1054 \pm 412	765 \pm 229	597 \pm 246	422 \pm 164	438 \pm 222
Total	1237 \pm 373	1077 \pm 533	789 \pm 253	651 \pm 312	442 \pm 188	417 \pm 251
	Cociente CD4/CD8		Céls. CD4 ⁺ CD28 ⁺		Céls. CD8 ⁺ CD28 ⁺	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	2,16 \pm 0,79	1,82 \pm 0,82	831 \pm 272	642 \pm 241	270 \pm 115	231 \pm 154
6 m	2,13 \pm 0,87	1,86 \pm 0,78	786 \pm 240	580 \pm 249	267 \pm 111	197 \pm 135
12 m	2,22 \pm 0,90	1,77 \pm 0,65	774 \pm 238	613 \pm 188	270 \pm 147	206 \pm 123
18 m	2,25 \pm 0,90	1,54 \pm 0,46	794 \pm 205	556 \pm 177	269 \pm 136	203 \pm 125
Total	2,19 \pm 0,85	1,75 \pm 0,68	797 \pm 236	597 \pm 213	269 \pm 125	209 \pm 132
	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos
Basal	2,01 \pm 0,83	1,95 \pm 0,72	777 \pm 266	515 \pm 212	261 \pm 132	190 \pm 141
6 m	1,99 \pm 0,87	2,15 \pm 0,41	730 \pm 248	421 \pm 218	247 \pm 125	147 \pm 105
12 m	2,07 \pm 0,85	1,60 \pm 0,40	714 \pm 231	602 \pm 208	241 \pm 142	236 \pm 124
18 m	2,01 \pm 0,82	1,34 \pm 0,41	716 \pm 221	469 \pm 100	242 \pm 136	219 \pm 125
Total	2,02 \pm 0,83	1,76 \pm 0,55	734 \pm 241	502 \pm 184	248 \pm 132	198 \pm 116
	Céls. CD4 ⁺ CTLA4 ⁺		Céls. CD8 ⁺ CTLA4 ⁺		Céls. CD3 ⁺ CD95 ⁺	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	5,28 \pm 5,03	4,02 \pm 2,84	2,43 \pm 2,15	3,19 \pm 3,73	842 \pm 370	807 \pm 463
6 m	3,60 \pm 2,42	3,45 \pm 2,18	1,90 \pm 1,74	2,65 \pm 3,72	754 \pm 377	820 \pm 455
12 m	4,36 \pm 4,00	4,02 \pm 2,97	2,70 \pm 2,32	3,36 \pm 3,19	795 \pm 210	855 \pm 351
18 m	4,44 \pm 4,36	5,20 \pm 6,88	2,30 \pm 3,05	3,65 \pm 3,85	821 \pm 215	781 \pm 353
Total	4,42 \pm 4,02	4,17 \pm 4,10	2,33 \pm 2,33	3,21 \pm 3,56	803 \pm 299	816 \pm 399
	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos
Basal	4,76 \pm 4,43	4,38 \pm 1,38	3,04 \pm 3,04	0,85 \pm 0,76	878 \pm 394	453 \pm 342
6 m	3,44 \pm 2,42	4,20 \pm 0,24	2,35 \pm 2,94	1,49 \pm 1,34	815 \pm 390	564 \pm 541
12 m	4,33 \pm 3,68	3,32 \pm 2,17	3,08 \pm 2,84	2,44 \pm 1,80	800 \pm 215	987 \pm 602
18 m	5,02 \pm 5,88	3,08 \pm 1,73	2,82 \pm 3,54	3,58 \pm 3,07	805 \pm 245	790 \pm 536
Total	4,39 \pm 4,28	3,74 \pm 1,50	2,82 \pm 3,08	2,09 \pm 2,03	824 \pm 319	698 \pm 507

TABLA XIV. Número de células/ μ L CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺, CTLA4⁺ y CD95⁺, en relación con la aparición de metástasis.

	Céls. CD3 ⁺			Céls. CD4 ⁺			Céls. CD8 ⁺		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	1276 ± 350	1294 ± 582	1352 ± 813	798 ± 216	921 ± 558	784 ± 408	473 ± 215	372 ± 117	537 ± 368
6 m	1180 ± 297	1376 ± 521	1163 ± 865	741 ± 182	966 ± 539	711 ± 480	439 ± 179	413 ± 97	432 ± 373
12 m	1211 ± 359	1080 ± 388	1287 ± 465	767 ± 224	783 ± 347	770 ± 248	426 ± 178	334 ± 126	499 ± 238
18 m	1206 ± 324	1089 ± 397	1081 ± 361	766 ± 215	773 ± 368	620 ± 219	439 ± 172	308 ± 66	441 ± 192
Total	1218 ± 330	1210 ± 449	1221 ± 617	768 ± 208	861 ± 423	721 ± 333	444 ± 184	357 ± 101	477 ± 282
Cociente CD4/CD8									
Basal	1,96 ± 0,79	2,49 ± 1,11	1,82 ± 0,69	746 ± 199	861 ± 539	647 ± 348	260 ± 126	191 ± 80	262 ± 202
6 m	1,95 ± 0,82	2,40 ± 1,22	1,98 ± 0,53	683 ± 154	896 ± 522	572 ± 387	240 ± 118	215 ± 81	227 ± 202
12 m	2,03 ± 0,82	2,41 ± 1,17	1,63 ± 0,35	713 ± 227	712 ± 323	632 ± 192	249 ± 148	177 ± 118	250 ± 111
18 m	1,94 ± 0,75	2,51 ± 1,24	1,39 ± 0,37	719 ± 210	711 ± 345	510 ± 127	253 ± 143	162 ± 75	232 ± 112
Total	444 ± 184	357 ± 101	477 ± 282	715 ± 197	795 ± 406	590 ± 267	251 ± 132	186 ± 83	243 ± 150
Cociente CD4/CTLA4									
Basal	4,70 ± 4,42	6,05 ± 5,07	3,67 ± 1,99	2,76 ± 2,14	5,24 ± 6,56	0,86 ± 0,66	833 ± 329	918 ± 571	721 ± 668
6 m	3,48 ± 2,50	3,84 ± 2,04	3,52 ± 1,53	1,94 ± 1,73	5,14 ± 6,74	1,37 ± 1,19	753 ± 311	938 ± 556	810 ± 722
12 m	4,69 ± 3,91	2,85 ± 1,58	2,98 ± 2,03	3,36 ± 3,04	1,97 ± 0,82	2,10 ± 1,73	804 ± 201	757 ± 342	963 ± 524
18 m	5,38 ± 6,33	2,09 ± 0,67	4,06 ± 2,66	2,91 ± 3,74	1,23 ± 0,73	4,26 ± 3,06	803 ± 225	803 ± 412	801 ± 465
Total	4,56 ± 4,49	3,71 ± 2,99	3,55 ± 1,96	2,74 ± 2,78	3,40 ± 4,63	2,15 ± 2,18	798 ± 269	854 ± 436	824 ± 561

Las cifras basales de las células CD8⁺CD28⁺ se modificaron menos que las de las células CD4⁺CD28⁺ entre los distintos grupos de estudio (tablas XIII y XIV). Sólo se encontró significación estadística en la menor concentración basal de células CD8⁺CD28⁺ en los enfermos de mayor edad en comparación con el grupo de pacientes más jóvenes ($P=0,03$) (tabla XV). No hubo diferencias significativas en el número de estas células en relación con el sexo (tabla XV).

Para diferenciar entre grupos de enfermos, se podía extraer más información cuando se comparaba el número basal de células CD8⁺ según su expresión o no de CD28, mediante el cociente CD8⁺CD28⁺ / CD8⁺CD28⁻. Aunque sin resultar significativo, los valores basales de dicho cociente eran más bajos en los enfermos con melanomas de mayor espesor ($P=0,06$), en los que fallecieron y en los grupos MR y MV (ver primera muestra en figuras 5, 6 y 7 respectivamente).

El valor basal del cociente CD8⁺CD28⁺ / CD8⁺CD28⁻ era inferior en los pacientes de mayor edad que en los más jóvenes, aunque dicha diferencia tenía aún menor significación que los cambios descritos en el párrafo anterior. Sin embargo, si se estudiaba exclusivamente el grupo de enfermos mayores de 40 años de edad, el mencionado cociente era significativamente más bajo en los pacientes con melanomas de mayor espesor ($P=0,017$); por el contrario, en el resto de grupos, los cambios en dicho cociente seguían sin ser significativos.

El estudio de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ que expresaban CTLA-4 demostró que se trataba de poblaciones escasamente representadas (tablas XIII-XV). Debido a las limitaciones de la citometría de flujo para niveles tan bajos de detección, no se valoraron las diferencias en la concentración de estas células.

B) Linfocitos CD3⁺ que expresan CD95⁺ o CD16/56⁺

En cuanto a la expresión basal de la molécula APO-1/Fas (CD95), no se observó ninguna modificación significativa entre los diversos grupos de pacientes estudiados (tablas XIII-XV). Lo mismo sucedió al analizar las diferencias en la concentración basal de células CD3⁺CD16/56⁺ (tablas XV-XVII).

No se detectó expresión de CD95L en las muestras basales de ninguno los pacientes estudiados.

C) Células CD19⁻CD5⁺ con expresión de CD80⁺ o CD86⁺

Como consecuencia del protocolo de marcaje aplicado se pudo determinar la existencia de dos subtipos de linfocitos CD19⁻CD5⁺, en función de la coexpresión de CD80 o CD86, sin que se pudiera demostrar una relación estricta entre su concentración al inicio del estudio y el pronóstico o evolución de la enfermedad, ni tampoco con la edad o el sexo (tablas XV-XVII).

3.1.1.2. Expresión de CD80, CD86 y CD95 en linfocitos B (CD19⁺)

Paralelamente al estudio de linfocitos T, se estudió también la población basal de linfocitos B totales (células CD19⁺) y sus subpoblaciones en función de la coexpresión de moléculas a las que se les ha asignado un papel coestimulador en la respuesta inmunitaria. Es decir, se analizaron tanto las células B totales como las CD19⁺CD80⁺, CD19⁺CD86⁺ y CD19⁺CD80⁺CD86⁺. Además, se estudió la población CD19⁺CD95⁺ (tablas XVIII y XIX).

El análisis realizado mostró que el valor de linfocitos B totales no ofrecía cambios de interés al inicio del estudio, que pudieran orientar sobre la posterior evolución de los pacientes (tablas XVIII y XIX).

Al profundizar en el estudio de los subtipos de células B, se observó que los linfocitos CD19⁺CD80⁺ tenían una más alta representación, en el momento basal, en los pacientes con melanomas de menor espesor, en los que tenían mayor supervivencia y en el grupo NM, siendo significativas las diferencias, respectivamente, con los pacientes con tumores de mayor grosor ($P=0,003$), los que fallecieron ($P=0,003$) y, en menor grado, con el grupo MV ($P=0,033$).

Por el contrario, el número basal de linfocitos CD19⁺CD86⁺ no se modificó ostensiblemente en función de los parámetros anteriores.

Se demostró una población residual de células CD19⁺CD80⁺CD86⁺, que descendía en relación con el mayor espesor ($P=0,021$) y el fallecimiento del enfermo ($P=0,024$), es decir, en el mismo sentido que las células CD19⁺CD80⁺, aunque con menor significación. No obstante, en dicha población doble positiva

para CD80 y CD86, no se demostraron cambios significativos en relación con la aparición de metástasis.

Las células CD19⁺CD95⁺ no mostraron ninguna diferencia significativa intergrupo en sus cifras basales, a excepción de las observadas entre los dos grupos de edad (tablas XV, XVIII y XIX).

Los linfocitos B totales, y la mayoría de sus subtipos, sufrieron una disminución significativa de sus cifras basales en relación con la mayor edad de los pacientes. La población CD19⁺CD95⁺ era la que más disminuía en los enfermos mayores de 40 años en comparación con los más jóvenes ($P=0,003$), descenso también observado en las cifras basales de los linfocitos CD19⁺CD80⁺ ($P=0,015$), CD19⁺CD86⁺ ($P=0,017$), CD19⁺ ($P=0,025$) y CD19⁺CD80⁺CD86⁺ ($P=0,038$) (ver tabla XV).

Para intentar distinguir si los cambios observados en las distintas subpoblaciones de células B podían ser secundarios a la diferente edad de los pacientes, se analizaron de nuevo dichos cambios tras eliminar a los pacientes menores de 40 años. Si el análisis estadístico se limitaba a los pacientes mayores de 40 años, con lo cual se limitaba el posible sesgo debido a la edad del individuo, se pudo comprobar lo siguiente:

- a) Seguían sin producirse diferencias significativas intergrupo en los valores basales de células B totales (CD19⁺).
- b) Las diferencias en las cifras basales de células CD19⁺CD80⁺ seguían siendo significativas, aunque en menor grado, tanto en función del espesor de Breslow, como de la supervivencia y del desarrollo de metástasis. Así, dichas células eran menos numerosas en los pacientes con melanomas de mayor espesor ($P=0,015$), en los que fallecieron ($P=0,023$) y en el grupo MV frente al NM ($P=0,026$).
- c) Seguían sin poder demostrarse cambios significativos intergrupo en los valores basales de células CD19⁺CD86⁺.
- d) Se perdía la significación de las diferencias observadas en las cifras basales de las células CD19⁺CD80⁺CD86⁺ que, no obstante, también estaban menos representadas en los pacientes con melanomas de

mayor espesor ($P=0,06$), en los que fallecieron ($P=0,08$) y en el grupo MV frente al NM ($P=0,06$).

- e) Tampoco había cambios significativos intergrupo en las cifras basales de las células $CD19^+CD95^+$.

3.1.1.3. Células de fenotipo $CD3^-CD16/56^+$ (células NK)

La concentración basal de células NK totales, definidas por la ausencia de CD3 y la expresión de CD16/56, no variaba significativamente en función del espesor tumoral, la supervivencia o la extensión de la enfermedad, ni tampoco en relación con la edad o el sexo.

Tampoco se observó ningún cambio significativo intergrupo en las cifras basales de ninguno de los dos subtipos diferentes de células NK distinguibles en función de la coexpresión o no de CD8 (tablas XV-XVII).

A pesar de todo, en las muestras basales, ya se pudieron observar algunas tendencias no significativas en cuanto a la diferente distribución intergrupo de los referidos subtipos de células NK. Así, los pacientes que fallecieron y los que sufrieron metástasis viscerales tenían, respectivamente, menos células NK $CD8^+$ que los enfermos que sobrevivieron y los pertenecientes al grupo NM.

En consonancia con lo anterior, tomando los datos basales, el cociente $CD3^-CD16/56^+CD8^+ / CD3^-CD16/56^+CD8^-$ fue mayor en los pacientes que sobrevivieron ($0,87 \pm 0,54$) que en los que fallecieron ($0,57 \pm 0,22$) ($P=0,29$). Además, dicho cociente era más alto en el grupo MR y en el MV, en comparación con el NM ($P=0,27$ y $P=0,16$ respectivamente), debido fundamentalmente a la expansión de la población NK $CD8^-$ en el grupo MR y a la pérdida de células NK $CD8^+$ en el grupo MV. Sin embargo, en los enfermos mayores de 40 años, este cociente no sólo no disminuyó sino que aumentó ligeramente en comparación con los pacientes más jóvenes.

TABLA XV. Concentración basal de los diversos tipos celulares estudiados (células/ μ L), con respecto a la edad y el sexo de los pacientes.

POBLACIÓN CELULAR	EDAD (años)		SEXO	
	≤ 40	> 40	Hombre	Mujer
Linfocitos T				
CD3 ⁺	1666 \pm 363 *	1188 \pm 422 *	1268 \pm 537	1310 \pm 368
CD3 ⁺ CD95 ⁺	1096 \pm 386	754 \pm 390	822 \pm 444	830 \pm 385
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ CD8 ⁺	108 \pm 62	122 \pm 112	144 \pm 130	96 \pm 64
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ CD8 ⁻	51 \pm 56	37 \pm 61	49 \pm 74	32 \pm 41
CD4 ⁺	1041 \pm 186 **	749 \pm 287 **	758 \pm 284	860 \pm 299
CD4 ⁺ CD28 ⁺	996 \pm 177 ***	678 \pm 254 ***	671 \pm 249	815 \pm 281
CD4 ⁺ CTLA4 ⁺	3,44 \pm 6,03	5,05 \pm 3,60	225 \pm 124	277 \pm 140
CD8 ⁺	597 \pm 191	437 \pm 232	505 \pm 290	438 \pm 160
CD8 ⁺ CD28 ⁺	363 \pm 144 *	222 \pm 115 *	225 \pm 124	277 \pm 140
CD8 ⁺ CTLA4 ⁺	1,46 \pm 2,11	3,13 \pm 3,07	3,45 \pm 3,80	2,14 \pm 1,72
CD19 ⁻ CD5 ⁺ CD80 ⁺	8,60 \pm 5,00	5,50 \pm 3,40	6,24 \pm 4,88	6,14 \pm 2,96
CD19 ⁻ CD5 ⁺ CD86 ⁺	35 \pm 28	36 \pm 16	39 \pm 20	32 \pm 19
Linfocitos B				
CD19 ⁺	215 \pm 67 *	148 \pm 69 *	162 \pm 90	162 \pm 56
CD19 ⁺ CD80 ⁺	80 \pm 40 *	41 \pm 27 *	48 \pm 36	51 \pm 33
CD19 ⁺ CD86 ⁺	29 \pm 9 *	19 \pm 8 *	22 \pm 10	20 \pm 9
CD19 ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁺	19 \pm 10 *	10 \pm 6 *	12 \pm 8	12 \pm 8
CD19 ⁺ CD95 ⁺	53 \pm 20 **	26 \pm 15 **	27 \pm 22	36 \pm 16
Células NK				
CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ CD8 ⁺	116 \pm 43	157 \pm 114	148 \pm 96	148 \pm 112
CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ CD8 ⁻	195 \pm 122	214 \pm 134	254 \pm 131	166 \pm 118
Células CD40⁺				
CD14 ⁺ CD40 ⁺	125 \pm 123	131 \pm 154	110 \pm 135	148 \pm 158
CD14 ⁻ CD40 ⁺	234 \pm 77	160 \pm 85	170 \pm 91	181 \pm 87
CD14 ⁻ CD40 ⁺ HLA-I ^{alto}	101 \pm 38 *	57 \pm 33 *	71 \pm 49	63 \pm 26
CD14 ⁻ CD40 ⁺ HLA-I ^{bajo}	132 \pm 62	102 \pm 72	99 \pm 61	118 \pm 78

Diferencias significativas para la concentración basal de cada población celular entre sujetos de edad ≤ 40 años y > 40 años: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,0001$

3.1.1.4. Células CD14⁺CD40⁺ y CD14⁻CD40⁺

En las muestras basales, ni el espesor tumoral, ni la supervivencia ni la extensión de la enfermedad pudieron asociarse con diferencias significativas en las cifras de las células CD14⁺CD40⁺, es decir, monocitos con expresión de CD40 (tablas XVIII y XIX). La concentración basal de dichas células tampoco se vio afectada por la edad ni el sexo (tabla XV).

Por otra parte, tampoco se demostraron diferencias significativas intergrupo en la concentración basal de células CD14⁻CD40⁺ (probablemente linfocitos B), cuando se analizaron de forma separada los dos subtipos observados en función de la intensidad de expresión alta o baja de moléculas HLA de clase I sobre dichas células (tablas XVIII y XIX). La única excepción fue el número significativamente más elevado de células CD14⁻40⁺ con alta expresión de HLA de clase I, en los pacientes menores de 40 años en comparación con los de mayor edad ($P=0,011$) (tabla XV).

Se obtuvo información más útil al analizar el cociente resultante de dividir el valor basal de las células CD14⁻40⁺ con expresión alta de HLA de clase I (CD14⁻CD40⁺HLA^{alto}) entre las de expresión baja (CD14⁻CD40⁺HLA^{bajo}), que era significativamente más alto en los enfermos que sobrevivieron que en los que fallecieron ($P=0,015$). En estos últimos, la concentración basal de las células CD14⁻CD40⁺HLA^{bajo} era más del doble de la que tenían las células CD14⁻CD40⁺HLA^{alto}. Por ello, en la muestra basal, el cociente CD14⁻CD40⁺HLA^{alto} / CD14⁻CD40⁺HLA^{bajo} fue $< 0,5$ en el 100% de los sujetos que fallecieron y $> 0,5$ en el 80% de los supervivientes. Por el contrario, al comparar dicho cociente entre los dos grupos de edad definidos en este estudio no se demostraron cambios significativos ($P=0,234$).

De modo análogo a lo observado al estudiar la expresión de CD95L en células mononucleares, tampoco se detectaron células que expresaran CD40L en las muestras basales de ninguno de los pacientes estudiados.

TABLA XVI. Número de células/ μL $\text{CD}3^+\text{CD}16/56^+\text{CD}8^+$, $\text{CD}5^+\text{CD}19^+\text{CD}80^+$ y $\text{CD}5^+\text{CD}19^+\text{CD}86^+$ en los distintos grupos de pacientes según espesor tumoral ($\leq 2\text{ mm}$ vs $> 2\text{ mm}$) y la supervivencia.

	$\text{CD}3^+\text{CD}16/56^+\text{CD}8^+$		$\text{CD}3^+\text{CD}16/56^+\text{CD}8^+$		Cels. $\text{CD}5^+\text{CD}19^+\text{CD}80^+$	
	$\leq 2\text{ mm}$	$> 2\text{ mm}$	$\leq 2\text{ mm}$	$> 2\text{ mm}$	$\leq 2\text{ mm}$	$> 2\text{ mm}$
Basal	27 ± 29	56 ± 81	89 ± 59	155 ± 132	$6,8 \pm 3,9$	$5,5 \pm 4,1$
6 m	28 ± 36	53 ± 84	94 ± 81	126 ± 100	$8,1 \pm 8,7$	$3,8 \pm 3,8$
12 m	33 ± 51	41 ± 61	87 ± 86	108 ± 70	$4,5 \pm 6,2$	$1,8 \pm 1,4$
18 m	28 ± 42	41 ± 60	86 ± 81	125 ± 87	$5,0 \pm 5,9$	$2,8 \pm 2,2$
Total	29 ± 40	48 ± 71	89 ± 76	128 ± 99	$6,1 \pm 6,4$	$3,5 \pm 3,3$
	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido
Basal	33 ± 36	94 ± 140	116 ± 98	142 ± 150	$6,5 \pm 4,0$	$3,8 \pm 2,5$
6 m	32 ± 36	95 ± 145	110 ± 88	102 ± 122	$6,6 \pm 7,4$	$2,5 \pm 1,1$
12 m	30 ± 42	85 ± 109	92 ± 78	128 ± 87	$3,5 \pm 5,0$	$1,4 \pm 0,8$
18 m	28 ± 36	76 ± 113	103 ± 87	109 ± 76	$4,3 \pm 4,8$	$1,6 \pm 1,1$
Total	31 ± 37	88 ± 119	105 ± 87	120 ± 102	$5,2 \pm 5,5$	$2,3 \pm 1,7$
	$\text{CD}5^+\text{CD}19^+\text{CD}86^+$		$\text{CD}3^+\text{CD}16/56^+\text{CD}8^+$		$\text{CD}3^+\text{CD}16/56^+\text{CD}8^+$	
	$\leq 2\text{ mm}$	$> 2\text{ mm}$	$\leq 2\text{ mm}$	$> 2\text{ mm}$	$\leq 2\text{ mm}$	$> 2\text{ mm}$
Basal	33 ± 17	39 ± 22	190 ± 102	232 ± 157	140 ± 60	159 ± 139
6 m	32 ± 17	37 ± 28	189 ± 104	203 ± 136	135 ± 61	131 ± 132
12 m	24 ± 12	33 ± 23	198 ± 105	194 ± 107	123 ± 68	104 ± 89
18 m	23 ± 11	35 ± 27	180 ± 116	179 ± 108	131 ± 72	123 ± 123
Total	28 ± 15	36 ± 27	189 ± 105	202 ± 127	132 ± 64	129 ± 121
	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido
Basal	37 ± 20	28 ± 9	217 ± 135	164 ± 87	158 ± 107	82 ± 24
6 m	34 ± 23	33 ± 25	207 ± 122	116 ± 23	145 ± 100	50 ± 10
12 m	27 ± 19	40 ± 14	197 ± 109	189 ± 74	120 ± 81	71 ± 26
18 m	27 ± 27	43 ± 21	188 ± 115	123 ± 56	137 ± 100	57 ± 32
Total	31 ± 23	36 ± 17	202 ± 119	148 ± 65	140 ± 97	65 ± 25

3.1.2. Cambios globales experimentados por las poblaciones celulares de sangre periférica durante el periodo de seguimiento

Al comparar los datos de las cuatro extracciones realizadas a cada paciente, los valores absolutos de leucocitos totales, linfocitos y monocitos, como ya ocurría en las muestras basales, no mostraron cambios globales significativos relacionados con el espesor del tumor, la supervivencia o la aparición de metástasis. No obstante, se apreciaron cifras más bajas de linfocitos totales en los pacientes con melanomas de mayor espesor y en los que fallecieron. En

cuanto a la posible influencia de la edad o el sexo, ninguno de estos dos factores ocasionó cambios globales significativos en las mencionadas poblaciones. Los monocitos se mantuvieron en cifras ligeramente más elevadas en los pacientes mayores de 40 años, hecho también observado al analizar las muestras basales.

3.1.2.1. Linfocitos T y sus subpoblaciones

La cifra media de las poblaciones CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ no mostró cambios significativos en relación con el espesor tumoral, la supervivencia o la aparición de metástasis (tablas XIII y XIV). Estas células presentaron siempre valores más bajos y estables en los pacientes mayores de 40 años que en los más jóvenes. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con los datos basales, los cambios globales de las células CD3⁺ y CD4⁺ no llegaron a alcanzar diferencias significativas entre ambos grupos de edad ($P=0,07$ y $P=0,06$, respectivamente). Dichas diferencias eran todavía menos ostensibles en el caso de las células CD8⁺ ($P=0,20$).

Cuando se analizó el cociente CD4/CD8, se observó que estaba significativamente más bajo en los pacientes con melanomas de mayor espesor ($P=0,02$). Estas diferencias eran patentes desde la primera muestra estudiada, y se hicieron mayores a partir del primer año de seguimiento (tabla XIII y figura 3a). Adicionalmente, mientras que en el grupo de supervivientes dicho cociente permanecía prácticamente invariable a lo largo del estudio, en los pacientes que fallecieron iba descendiendo progresivamente de manera significativa ($P<0,0001$). No obstante, las diferencias sólo fueron evidentes a partir del primer año de observación de los pacientes (tabla XIII y figura 3b). Por tanto, la determinación seriada del cociente CD4/CD8 podría orientar sobre la evolución y pronóstico de los enfermos con melanoma.

A diferencia de lo observado con respecto al espesor de Breslow y la supervivencia, no se demostró ningún cambio significativo del índice CD4/CD8 en relación con la presencia de metástasis (tabla XIV), la edad o el sexo.

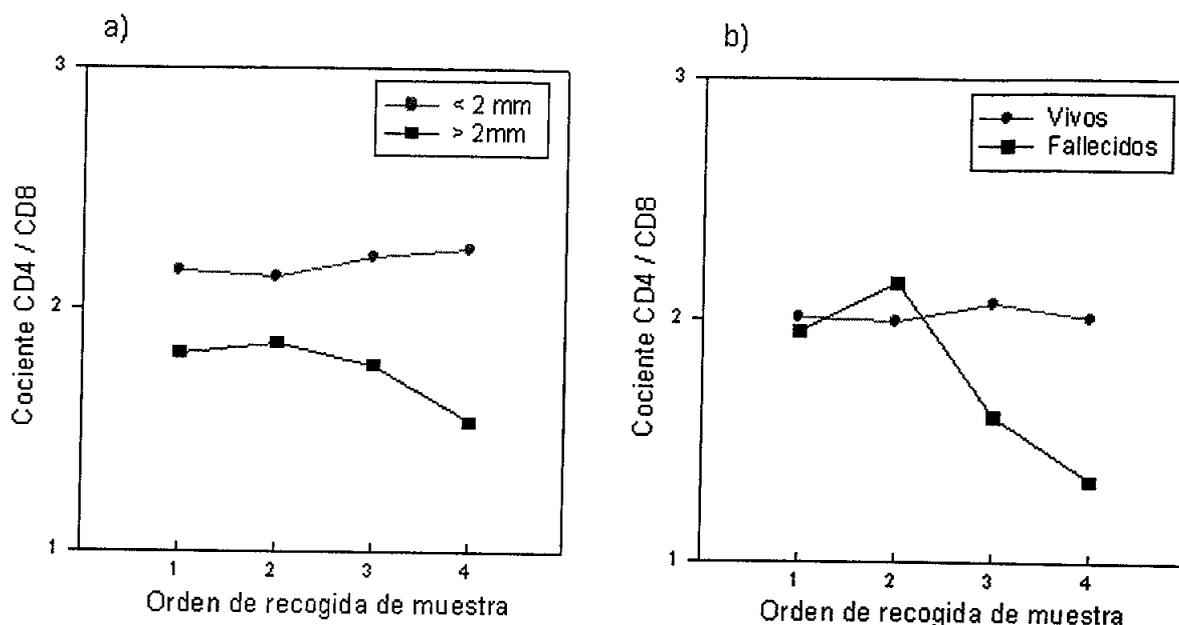


FIGURA 3. a) Evolución del cociente CD4/CD8 en relación con el espesor de Breslow. Obsérvense los valores más bajos de dicho cociente en los melanomas con espesor > 2 mm ($P=0,02$). b) Evolución del cociente CD4/CD8 con respecto a la supervivencia. Obsérvese el descenso del mismo en los enfermos que fallecieron ($P<0,0001$).

A) Expresión de CD28 y CTLA4 en células CD4⁺ y CD8⁺

Los valores globales de las células CD4⁺CD28⁺ eran significativamente más altos en los pacientes con melanomas de menor espesor, en los que sobrevivieron y en los de menor edad ($P=0,02$ en los tres casos) (tablas XIII y XV; figura 4). El grupo MV mostró cifras más bajas de estas células que los grupos NM y MR, sin que estas diferencias llegaran a ser significativas (tabla XIV).

En general, en los pacientes de la serie estudiada, la mayoría de las células CD4⁺ eran CD28⁺ mientras que las CD4⁺CD28⁻ constituían una población residual (relación aproximada de 10:1). Al comparar las cifras globales de células CD4⁺CD28⁺ y CD4⁺CD28⁻, se mantuvo el mismo fenómeno observado en las muestras basales, es decir, un aumento no significativo en el número de células CD4⁺CD28⁻, en detrimento de las CD4⁺CD28⁺, en los pacientes con melanomas de mayor espesor, en los que fallecieron y en el grupo MV (comparados respectivamente con los enfermos con melanomas de menor espesor, con los que sobrevivieron y con el grupo NM).

A diferencia de las células $CD4^+CD28^+$, los valores globales de las células $CD8^+CD28^+$ no sufrían modificaciones significativas en relación con el espesor del melanoma, la supervivencia del paciente o la aparición de metástasis (ver tablas XIII y XIV). Sin embargo, las células $CD8^+CD28^+$ mostraron valores globales más bajos en los enfermos mayores de 40 años que en los más jóvenes ($P < 0,05$).

Como ya ocurría con los valores basales, aunque sin llegar a obtener resultados significativos, resultó algo más informativo en cuanto a la correlación con el pronóstico, el cociente $CD8^+CD28^+ / CD8^+CD28^-$. Este cociente descendía en los pacientes con melanomas de mayor espesor (figura 5), en los que fallecieron (figura 6), y en los grupos MR y MV (figura 7), es decir, en los grupos con peor pronóstico, en los cuales el número de células $CD8^+CD28^-$ llegaba a igualar, o incluso a superar, al de células $CD8^+CD28^+$. Esto contrastaba con lo visto con las células $CD4^+CD28^+$, las cuales eran más numerosas que las $CD4^+CD28^-$ en todos los grupos de pacientes.

El cociente $CD28^+/CD28^-$ era más bajo en los enfermos mayores de 40 años que en el resto, tanto para las células $CD4^+$ como las $CD8^+$. No obstante, el análisis estadístico demostró que las diferencias en dicho cociente con respecto a la edad del paciente, eran menores que las observadas en relación con el espesor del tumor o la supervivencia del enfermo.

En cuanto al sexo, no se observó que afectara significativamente a la concentración de células $CD4^+CD28^+$ ni $CD8^+CD28^+$.

Con respecto a la expresión o no de CTLA4 en las células $CD4^+$ y $CD8^+$, no se observó ninguna diferencia significativa intergrupo. No obstante, se apreció una tendencia al aumento del número de células $CD8^+CTLA4^+$ en los pacientes que fallecieron y en el grupo MV, a partir de valores basales prácticamente indetectables (tablas XIII y XIV). En cualquier caso, las concentraciones tan bajas de las células $CD4^+CTLA4^+$ y $CD8^+CTLA4^+$ encontradas en sangre periférica, impidieron poder establecer conclusiones sobre dichas poblaciones.

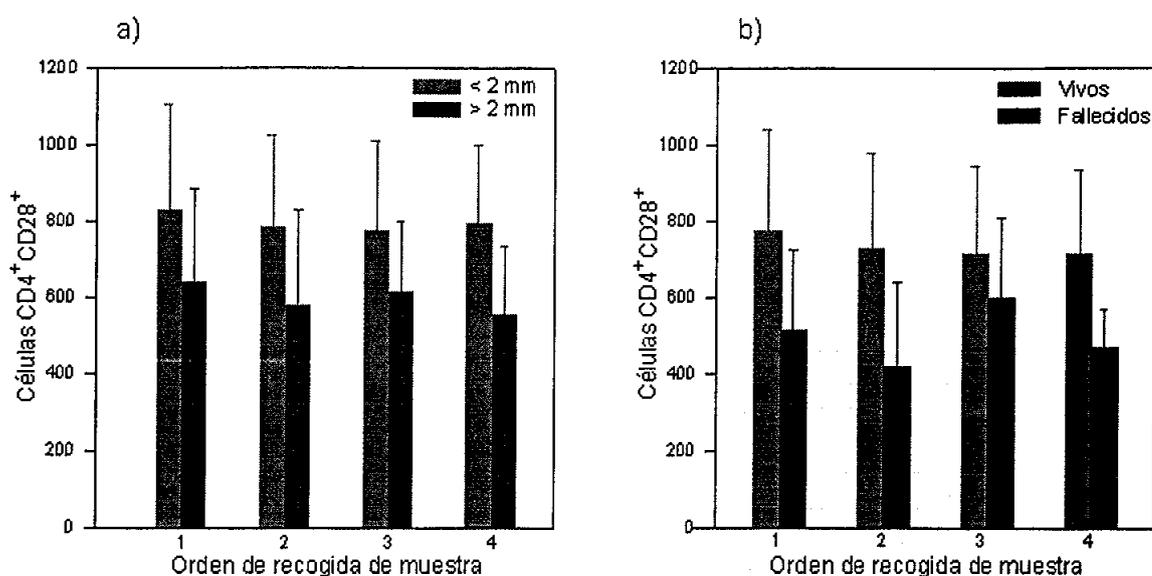


FIGURA 4. Número de células/ μL $\text{CD4}^+\text{CD28}^+$. Estas células eran más abundantes en los pacientes con melanomas de menor grosor (figura 4a) y en los enfermos que no fallecieron durante el seguimiento (figura 4b).

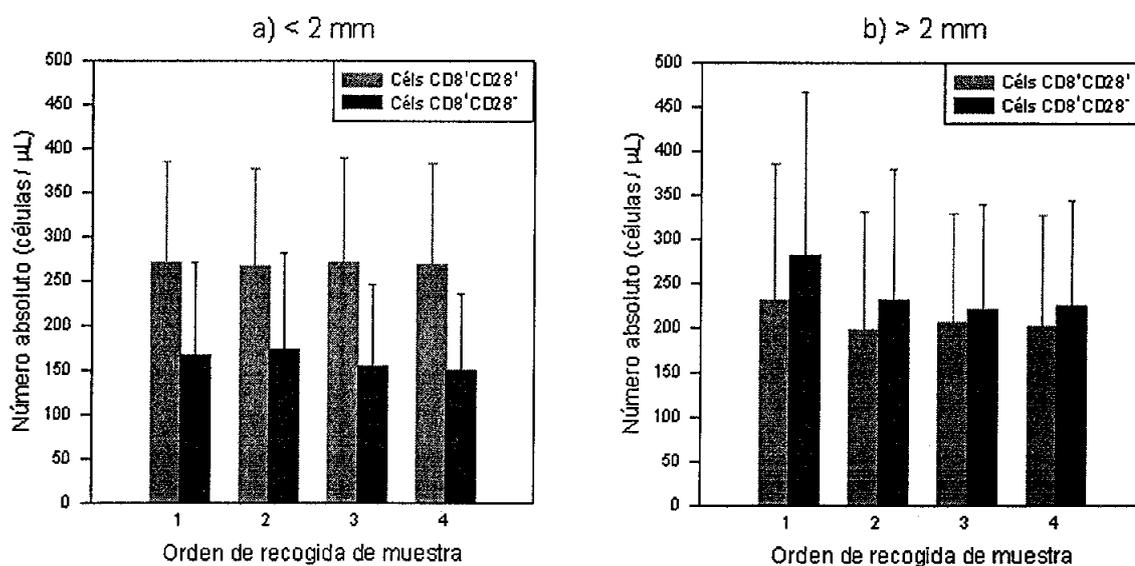


FIGURA 5. Número de células/ μL $\text{CD8}^+\text{CD28}^+$ y $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$: a) En los pacientes con melanomas de < 2 mm de espesor; b) En los enfermos con melanomas de espesor > 2 mm. En este último grupo, a diferencia del primero, se observó un predominio de las células $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ sobre las $\text{CD8}^+\text{CD28}^+$.

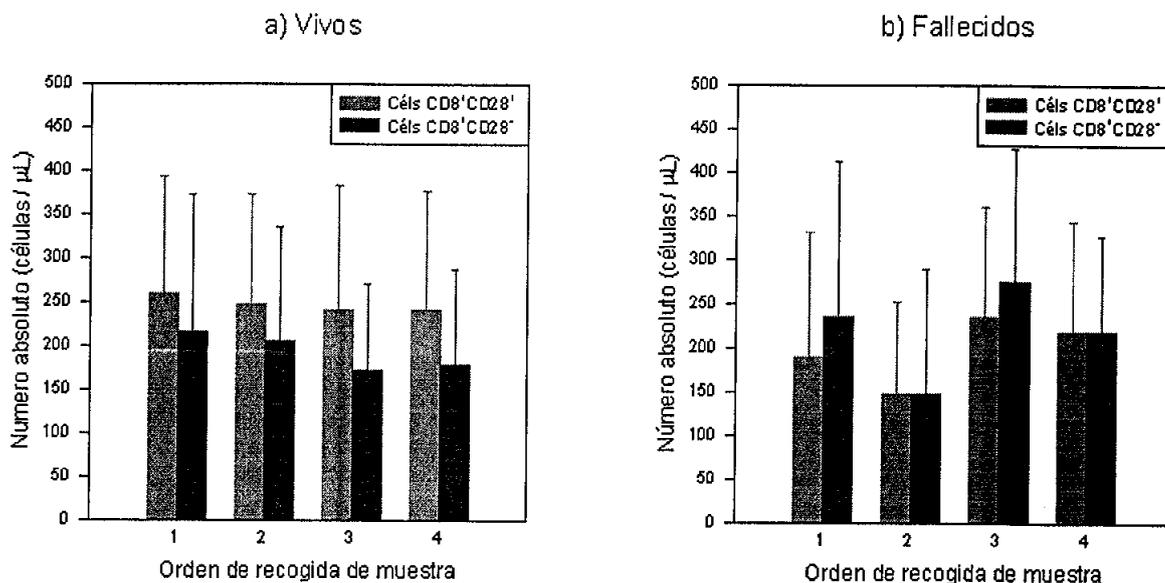


FIGURA 6. Número de células/μL CD8⁺CD28⁺ y CD8⁺CD28⁻ : a) En los pacientes que sobrevivieron; b) En los que fallecieron, en los cuales, a diferencia del grupo anterior, se demostró una igualdad o un predominio de células las CD8⁺CD28⁻ sobre las CD8⁺CD28⁺.

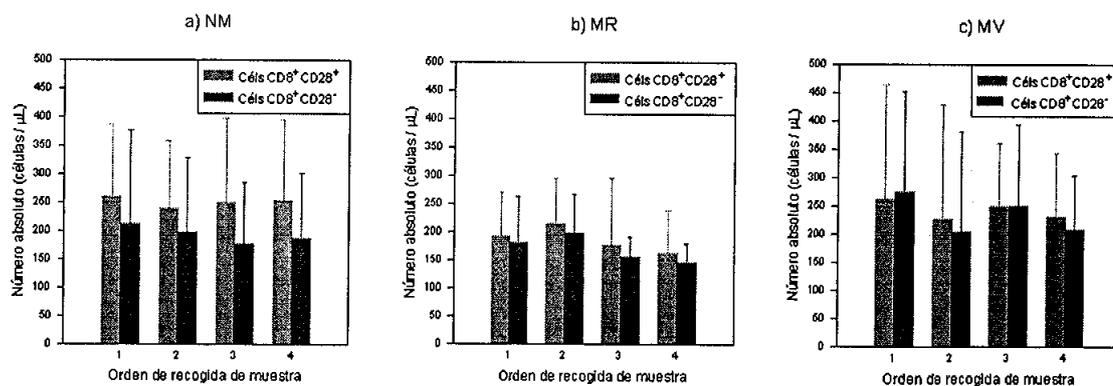


FIGURA 7. Número de células/μL CD8⁺CD28⁺ y CD8⁺CD28⁻ : a) En el grupo de pacientes que no desarrollaron metástasis (grupo NM); b) En el grupo que presentó sólo metástasis regionales (grupo MR); c) En el grupo donde aparecieron metástasis viscerales (grupo MV), que es donde se observó mayor proporción de células CD8⁺CD28⁻.

Para mostrar mejor las diferencias observadas en la expresión de la molécula CD28 en las células CD4⁺ y CD8⁺, a continuación se exponen los gráficos donde se puede comparar dicha expresión entre un paciente con melanoma prototipo de buen pronóstico (sobrevivió sin metástasis al final del

estudio) (figura 8) y otro enfermo con melanoma prototipo de mal pronóstico (falleció con metástasis viscerales múltiples) (figura 9).

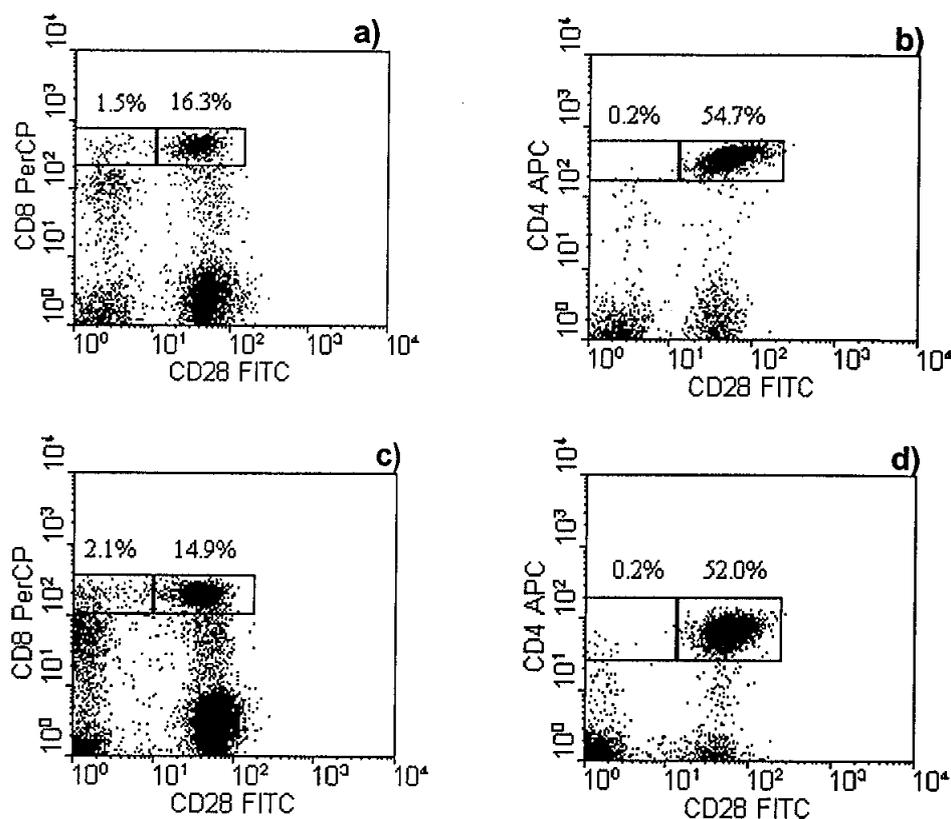


FIGURA 8. Representación de la distribución de la expresión de CD28 en relación con la expresión de CD4 y CD8 en un **enfermo prototipo de melanoma con buen pronóstico**.

Las dos figuras de la parte alta corresponden a la primera muestra de sangre obtenida: a) representa la expresión de CD8 y b) la de CD4. Ambos tipos de células son mayoritariamente CD28⁺.

Las dos figuras de la parte inferior representan el mismo tipo de células, pero en la última muestra obtenida: c) y d) representan los datos de la expresión de CD8 y CD4 respectivamente. Obsérvese que la distribución de la expresión de CD4, CD8 y CD28 no se modifica sensiblemente con respecto a la observada en la primera muestra (a y b).

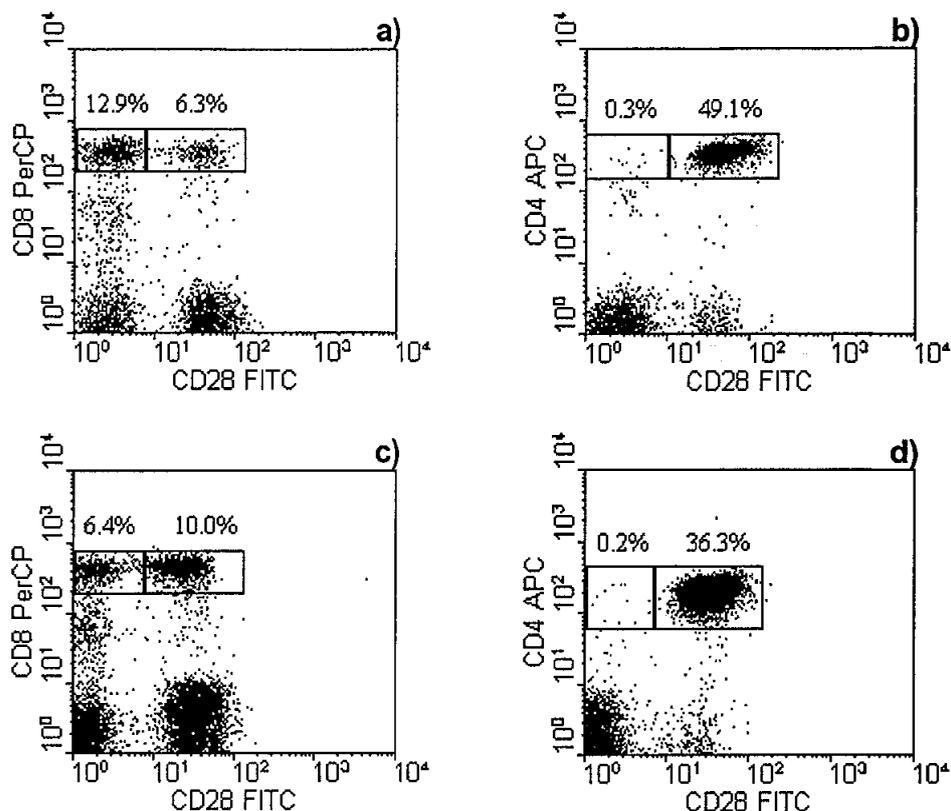


FIGURA 9. Expresión de CD28 en relación con la expresión de CD4 y CD8 en un **enfermo prototipo de melanoma con mal pronóstico**. a) y b) corresponden a la primera muestra de sangre. En a) se ve que las células CD8⁺CD28⁻ suponen el doble que las CD8⁺CD28⁺, y en b) se aprecia que las CD4⁺ son mayoritariamente CD28⁺. c) y d) corresponden a la última extracción. En c) se observa que las células CD8⁺CD28⁻ y CD8⁺CD28⁺ sufren una redistribución llegando casi a invertir la proporción inicial. No obstante, se conserva un cifra de células CD8⁺CD28⁻ sensiblemente superior a la del paciente prototipo de buen pronóstico. En d) se muestra que la distribución de las células CD4⁺CD28⁺ varía poco con el paso del tiempo.

B) Linfocitos CD3⁺ que expresan CD95 o CD16/56

Como ya ocurría en las determinaciones basales, no se demostraron diferencias significativas intergrupo en los valores globales de las células CD3⁺CD95⁺. La única excepción fue que, los pacientes que fallecieron, aunque partían de cifras basales más bajas de células CD3⁺CD95⁺ que los que

sobrevivieron, experimentaron un ascenso progresivo y significativo ($P < 0,05$) de dichas células a lo largo del tiempo, en comparación con los pacientes que sobrevivieron, cuyas cifras de células $CD3^+CD95^+$ se mantuvieron muy estables a lo largo del tiempo. De este modo, la concentración de células $CD3^+CD95^+$ en los enfermos con menor supervivencia, superaba o igualaba a la del resto de pacientes tras un año de seguimiento (tabla XIII). No se detectaron células $CD3^+CD95L^+$ en ninguna de las extracciones realizadas.

La concentración global de células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ no se modificó significativamente con el espesor tumoral o la supervivencia (tabla XVI y figura 10a), ni con la aparición de metástasis (tabla XVII y figura 10b). En cambio, las células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ eran más numerosas en los pacientes que fallecieron que en el resto ($P < 0,05$) (tabla XVI y figura 11a).

TABLA XVII. Número de células/ μ L $CD16/56^+$, $CD5^+CD19^+CD80^+$ y $CD5^+CD19^+CD86^+$ en relación con la aparición de metástasis.

	Céls. $CD3^+CD16/56^+CD8^+$			Céls. $CD3^+CD16/56^+CD8^-$		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	31 ± 35	24 ± 9	97 ± 126	119 ± 106	104 ± 52	135 ± 131
6 m	29 ± 36	26 ± 7	99 ± 137	110 ± 95	107 ± 51	103 ± 105
12 m	31 ± 46	20 ± 6	76 ± 97	96 ± 84	86 ± 39	110 ± 85
18 m	28 ± 39	18 ± 6	71 ± 99	110 ± 94	75 ± 38	96 ± 72
Total	30 ± 39	22 ± 7	86 ± 107	109 ± 94	93 ± 43	111 ± 94
	Céls. $CD5^+CD19^+CD80^+$			Céls. $CD5^+CD19^+CD86^+$		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	6,5 ± 3,6	3,4 ± 2,8	6,3 ± 5,9	33 ± 14	51 ± 31	41 ± 30
6 m	6,5 ± 7,7	3,6 ± 2,4	5,2 ± 6,2	30 ± 18	45 ± 37	45 ± 35
12 m	3,6 ± 5,3	3,2 ± 2,4	1,3 ± 0,7	28 ± 20	17 ± 5	36 ± 14
18 m	4,2 ± 5,2	4,8 ± 0,4	2,4 ± 1,9	28 ± 29	13 ± 1	39 ± 20
Total	5,2 ± 5,7	3,8 ± 2,0	3,8 ± 4,5	30 ± 21	31 ± 27	41 ± 24
	Céls. $CD3^+CD16/56^+CD8^-$			Céls. $CD3^+CD16/56^+CD8^+$		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	197 ± 128	322 ± 160	205 ± 118	158 ± 115	152 ± 4	103 ± 51
6 m	187 ± 111	314 ± 160	166 ± 114	142 ± 108	159 ± 9	77 ± 62
12 m	184 ± 108	314 ± 53	183 ± 66	118 ± 84	157 ± 63	69 ± 24
18 m	181 ± 119	252 ± 78	128 ± 49	139 ± 106	147 ± 46	57 ± 28
Total	187 ± 115	301 ± 108	170 ± 89	139 ± 103	154 ± 33	76 ± 44

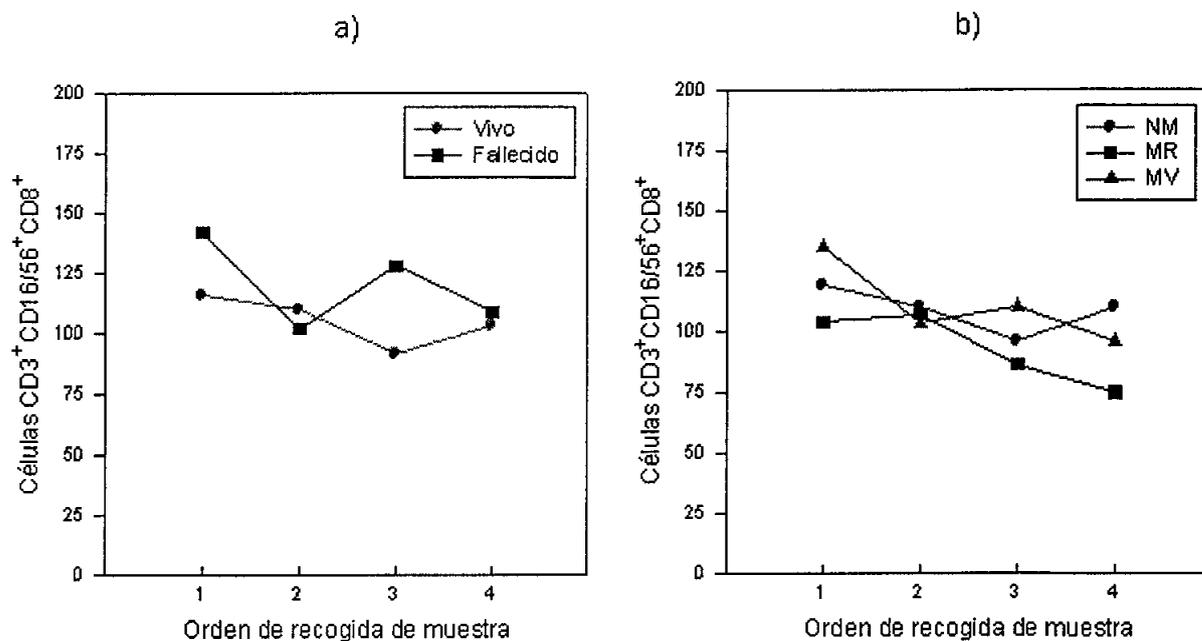


FIGURA 10. Número de células/ μL $CD3^+CD16/56^+CD8^+$: a) Evolución en relación con la supervivencia; b) Evolución en relación con la aparición de metástasis. Nótese las escasas diferencias en cuanto a las cifras medias de estas células entre grupos de pacientes con distinta supervivencia y extensión de la enfermedad.

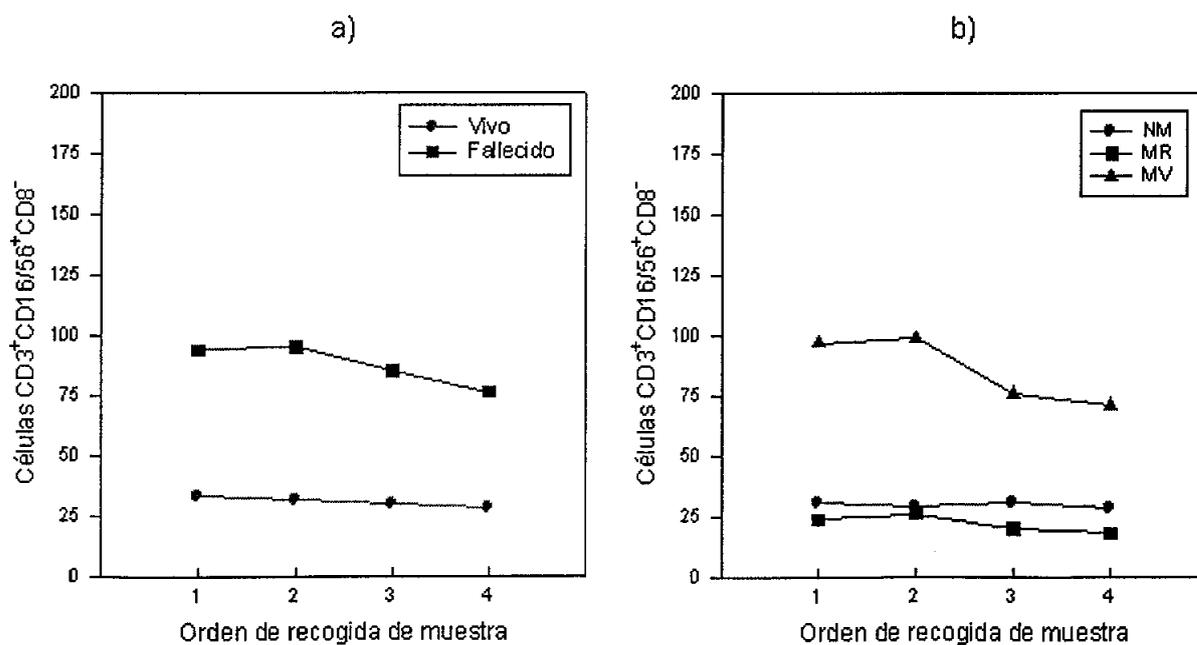


FIGURA 11. Número de células/ μL $CD3^+CD16/56^+CD8^-$: a) Evolución en relación con la supervivencia; b) Evolución en relación con la aparición de metástasis. Obsérvese la mayor concentración de estas células en los enfermos con menor supervivencia y con enfermedad más diseminada.

No se demostraron cambios significativos en los valores globales de células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ en relación con el espesor tumoral (tabla XVI). Por el contrario, sí se apreciaron cifras medias significativamente más elevadas de dichas células en los pacientes del grupo MV en comparación con el resto ($P<0,05$) (tabla XVII y figura 11b).

Las cifras globales de linfocitos $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ y $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ no se modificaban significativamente con la edad o el sexo del paciente.

C) Células $CD19^-CD5^+$ con expresión de $CD80$ o $CD86$

El valor global de células $CD19^-CD5^+CD80^+$ fue significativamente más bajo en los pacientes con melanomas de mayor grosor que en los que tenían tumores más finos ($P=0,01$) (tabla XVI). Dicho valor también era algo más bajo en los sujetos que fallecieron que en los que sobrevivieron ($P=0,06$) (tabla XVI y figura 12).

Las cifras globales de células $CD19^-CD5^+CD86^+$ no mostraron diferencias significativas intergrupo (tablas XVI). No obstante, resultó llamativo el descenso progresivo de esta población en el grupo de supervivientes frente al ascenso paulatino en los que fallecieron (figura 12).

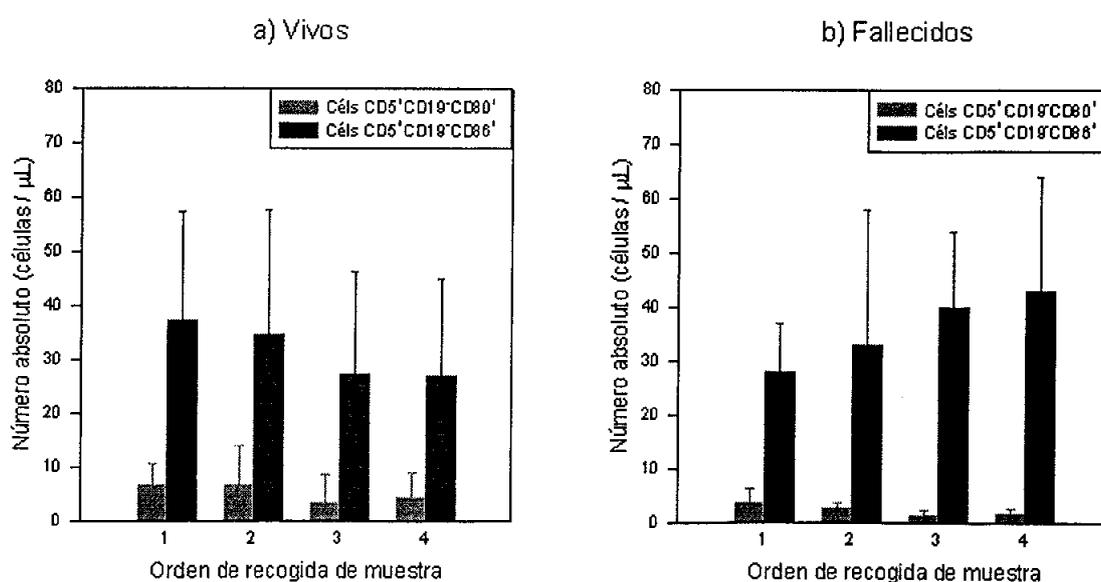


FIGURA 12. Evolución de los valores absolutos de células $CD5^+CD19^-CD80^+$ y $CD5^+CD19^-CD86^+$ con respecto a la supervivencia de los enfermos.

Ni las cifras globales de células $CD19^+CD5^+CD80^+$ ni las de la población $CD19^+CD5^+CD86^+$ variaban significativamente en relación con el desarrollo de metástasis (tabla XVII), la edad o el sexo.

3.1.2.2. Linfocitos B ($CD19^+$)

La concentración global de células $CD19^+$ no varió significativamente en relación con el espesor del tumor, la supervivencia o la aparición de metástasis (tablas XVIII y XIX). Sin embargo, el número de linfocitos B fue siempre más bajo en los pacientes mayores de 40 años ($P < 0,05$).

A) Expresión de $CD80$ y $CD86$ en linfocitos B ($CD19^+$)

El valor global de células $CD19^+CD80^+$ mostró bastantes diferencias significativas intergrupo (tablas XV, XVIII y XIX). La concentración de dichas células era menor en los pacientes con melanomas de mayor espesor ($P = 0,002$) (figura 13a), en los que fallecieron ($P = 0,001$) (figura 13b), y en los que padecieron metástasis, con independencia de que éstas fueran regionales o viscerales ($P = 0,01$ en ambos casos, en comparación con el grupo NM).

La edad también se relacionó con una diferente concentración de células $CD19^+CD80^+$, la cual era más baja en los sujetos de más de 40 años de edad ($P = 0,02$).

En contraste con las células $CD19^+CD80^+$, los valores globales de las células $CD19^+CD86^+$ no se modificaron significativamente en relación con el espesor, la supervivencia o la aparición de metástasis (tablas XVIII y XIX). Sin embargo, los pacientes menores de 40 años presentaron valores globales más altos de células $CD19^+CD86^+$ que los de mayor edad ($P = 0,01$).

Se encontró también una subpoblación $CD19^+CD80^+CD86^+$, cuyos valores globales eran significativamente más bajos en los enfermos que fallecieron que en el resto ($P = 0,01$), y en los mayores de 40 años con respecto a los más jóvenes ($P = 0,002$). Sin embargo, sus cifras globales no se afectaban significativamente ni por el espesor tumoral ni por la aparición de metástasis (tablas XVIII y XIX).

TABLA XVIII. Número de células/ μL que expresan las moléculas CD19 y CD40 en los distintos grupos de pacientes según el espesor tumoral (≤ 2 mm vs > 2 mm) y la supervivencia.

	CD19 ⁺		CD19 ⁺ CD80 ⁺		CD19 ⁺ CD86 ⁺	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	172 \pm 69	151 \pm 79	64 \pm 34 **	32 \pm 25 **	22 \pm 9	20 \pm 9
6 m	168 \pm 70	141 \pm 78	43 \pm 16	28 \pm 24	16 \pm 12	16 \pm 11
12 m	189 \pm 92	174 \pm 72	34 \pm 20	29 \pm 21	14 \pm 9	13 \pm 7
18 m	176 \pm 90	148 \pm 81	35 \pm 28	27 \pm 19	11 \pm 9	12 \pm 9
Total	176 \pm 79	154 \pm 77	44 \pm 28	29 \pm 22	16 \pm 10	15 \pm 9
	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido
Basal	168 \pm 68	122 \pm 105	54 \pm 33 **	12 \pm 4 **	21 \pm 9	19 \pm 10
6 m	160 \pm 70	121 \pm 103	39 \pm 20	14 \pm 12	17 \pm 12	10 \pm 6
12 m	182 \pm 85	184 \pm 71	34 \pm 21	17 \pm 11	14 \pm 8	8 \pm 3
18 m	165 \pm 91	148 \pm 32	34 \pm 25	16 \pm 12	12 \pm 9	7 \pm 2
Total	169 \pm 78	144 \pm 79	40 \pm 26	15 \pm 9	16 \pm 10	11 \pm 7
	CD19 ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁺		CD19 ⁺ CD95 ⁺		CD14 ⁺ CD40 ⁺	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	14 \pm 8 *	9 \pm 7 *	34 \pm 18	29 \pm 21	107 \pm 137	156 \pm 157
6 m	10 \pm 8	7 \pm 8	25 \pm 13	27 \pm 19	85 \pm 107	160 \pm 138
12 m	7 \pm 4	6 \pm 3	30 \pm 19	25 \pm 13	117 \pm 126	103 \pm 138
18 m	6 \pm 5	7 \pm 7	27 \pm 19	19 \pm 12	47 \pm 54	82 \pm 120
Total	9 \pm 7	7 \pm 6	29 \pm 17	25 \pm 17	89 \pm 112	125 \pm 139
	Vivo	Fallecido	Vivos	Fallecidos	Vivo	Fallecido
Basal	13 \pm 8 *	4 \pm 2 *	33 \pm 19	21 \pm 21	119 \pm 141	206 \pm 179
6 m	9 \pm 8	3 \pm 3	27 \pm 16	17 \pm 13	113 \pm 128	161 \pm 121
12 m	7 \pm 3	3 \pm 2	29 \pm 16	18 \pm 12	116 \pm 29	74 \pm 123
18 m	7 \pm 6	3 \pm 2	25 \pm 17	14 \pm 10	61 \pm 88	76 \pm 122
Total	9 \pm 7	3 \pm 2	28 \pm 17	17 \pm 13	102 \pm 124	129 \pm 137
	CD14 ⁺ CD40 ⁺		CD14 ⁺ CD40 ⁺ HLA-DR ⁺		CD14 ⁺ CD40 ⁺ HLA-DR ⁺	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	189 \pm 87	159 \pm 88	74 \pm 31	57 \pm 44	115 \pm 73	101 \pm 67
6 m	158 \pm 58	140 \pm 76	63 \pm 24	56 \pm 44	95 \pm 45	83 \pm 54
12 m	175 \pm 72	149 \pm 55	66 \pm 30	50 \pm 25	108 \pm 56	99 \pm 51
18 m	171 \pm 90	163 \pm 74	71 \pm 34	64 \pm 33	100 \pm 66	98 \pm 56
Total	174 \pm 77	153 \pm 73	69 \pm 30	57 \pm 37	105 \pm 60	95 \pm 57
	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido
Basal	181 \pm 86	136 \pm 106	71 \pm 36	34 \pm 40	110 \pm 72	102 \pm 66
6 m	154 \pm 63	119 \pm 95	65 \pm 32	20 \pm 14	88 \pm 43	98 \pm 92
12 m	163 \pm 67	165 \pm 58	62 \pm 29	35 \pm 13	100 \pm 53	130 \pm 54
18 m	170 \pm 87	150 \pm 34	70 \pm 34	53 \pm 25	99 \pm 65	97 \pm 39
Total	167 \pm 76	143 \pm 72	67 \pm 33	35 \pm 26	99 \pm 59	107 \pm 58

Diferencias significativas entre valores basales: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$

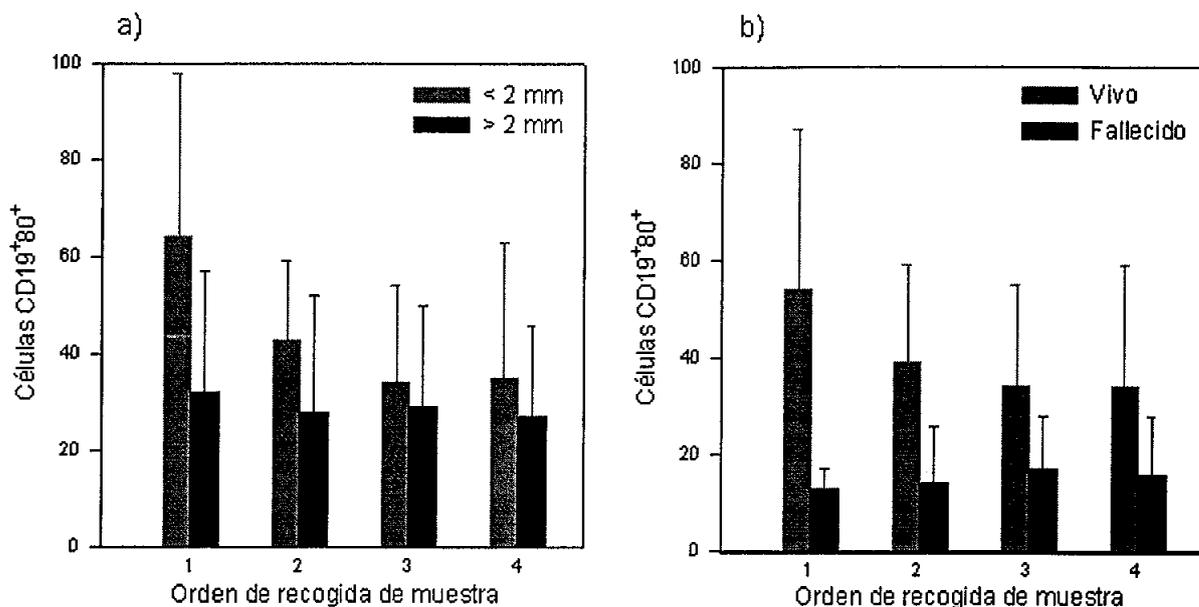


FIGURA 13. Concentración de células CD19⁺CD80⁺ (células/μL) en relación: a) con el espesor de Breslow; y b) con la supervivencia del enfermo. Nótase la presencia de valores más bajos de estas células en los enfermos con peor pronóstico.

B) Expresión de CD95 en Linfocitos B (CD19⁺)

Al comparar los pacientes que fallecieron con el resto, las cifras globales de células CD19⁺CD95⁺ fueron significativamente más bajas en los primeros ($P=0,03$) (tabla XVIII). Sin embargo, los valores globales de estas células no experimentaron cambios significativos en relación con el espesor del melanoma, ni con el desarrollo de metástasis (tablas XVIII y XIX).

La edad se asoció con diferencias significativas en los valores globales de la población CD19⁺CD95⁺, que fueron más elevados en los pacientes más jóvenes ($P=0,002$).

3.1.2.3. Células de fenotipo CD3⁻CD16/56⁺ (células NK)

Las cifras globales de las células CD3⁻CD16/56⁺ se modificaron poco en relación con el espesor tumoral a lo largo del periodo de seguimiento. Este subtipo de leucocitos sí presentó diferencias significativas al comparar sus valores globales entre los pacientes que sobrevivieron y los que fallecieron, siendo la cifra media menor en estos últimos ($P<0,05$). En la comparación por

grupos de metástasis, las diferencias fueron aún más relevantes, predominando esta población en el grupo MR respecto al MV ($P < 0,01$).

En la comparación por grupos de edad, se observaron cambios bastante llamativos, consistentes en que los pacientes mayores de 40 años tenían cifras medias de células NK más elevadas y constantes en el tiempo que los individuos de menos de 40 años de edad. Sin embargo, estas diferencias no llegaban a ser significativas.

Como ya se señaló en los resultados basales, se pudieron establecer dos subtipos de células NK en función de la coexpresión o no del receptor CD8:

A) Células $CD3^-CD16/56^+CD8^+$

En general, en los pacientes con melanoma considerados en conjunto, la concentración de células $CD3^-CD16/56^+CD8^+$ siempre se mantuvo más baja que la de la población $CD3^-CD16/56^+CD8^-$ ($P < 0,01$), hecho también observado en los distintos grupos de enfermos considerados por separado.

Con respecto al espesor del tumor, no se observaron diferencias significativas en las cifras globales de las células $CD3^-CD16/56^+CD8^+$ (tabla XVI).

En cuanto a la relación con la supervivencia de los enfermos y la aparición de metástasis, la concentración de células $CD3^-CD16/56^+CD8^+$ siempre fue más baja en los enfermos que fallecieron que en los que permanecían vivos ($P = 0,048$) (tabla XVI y figura 14), y en el grupo MV que en los grupos NM y MR ($P = 0,02$) (tabla XVII y figura 15a).

Con respecto a la edad, las células $CD3^-CD16/56^+CD8^+$ se comportaron de modo similar a como lo hacía la población total de células NK, es decir, con valores globales más constantes y elevados en los pacientes de más de 40 años de edad que en los más jóvenes, aunque sin que dichas diferencias llegaran a ser significativas. No obstante, los cambios observados en el número de células $CD3^-CD16/56^+CD8^+$ en relación con la edad eran más ostensibles que los apreciados para las células $CD3^-CD16/56^+CD8^-$ (ver tabla XV).

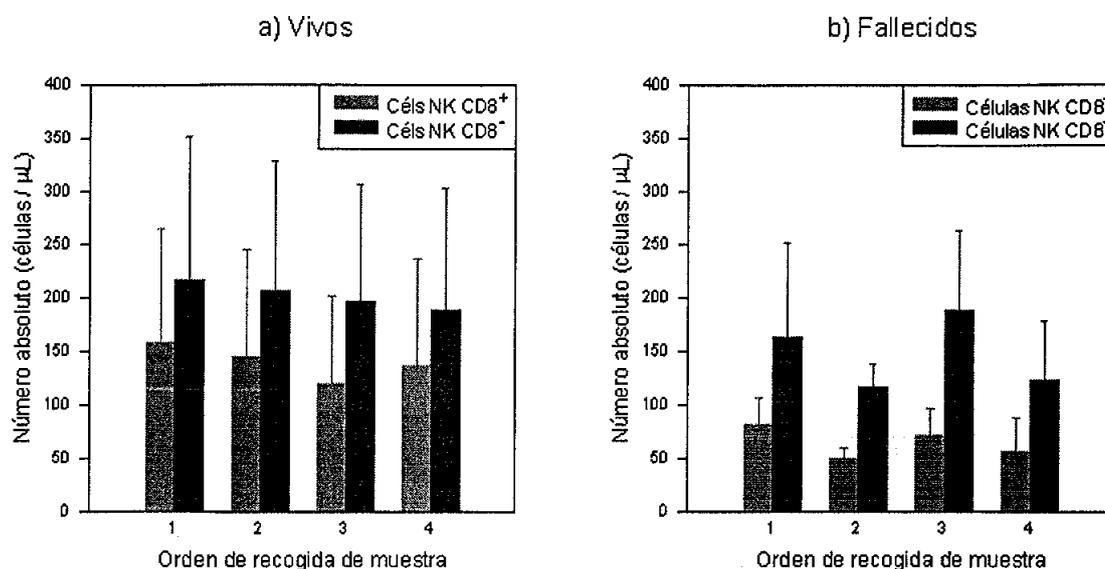


FIGURA 14. Valores absolutos de células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ y $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ en relación con la supervivencia: a) En los pacientes que permanecían vivos al final del estudio; b) En los enfermos que fallecieron. Obsérvese el descenso en el número de células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ que se produce en b) en comparación con a). Además, en b) existe una mayor proporción de células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ que en a).

B) Células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$

Con respecto al espesor, como ocurría con la población anterior, no se observaron diferencias significativas en las cifras globales de células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ (tabla XVI).

En contraste con lo observado para las células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$, a pesar de que los valores medios de las células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ estaban siempre más bajos en los enfermos que fallecieron que en los supervivientes, dichas diferencias no resultaron significativas (tabla XVI y figura 14).

En cuanto a la relación con la aparición de metástasis, el comportamiento también fue distinto al de las células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$, de modo que en el grupo MR las células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ se mantuvieron siempre más altas que en los grupos NM y MV ($P=0,039$) (tabla XVII y fig. 15b).

En las sucesivas muestras que se fueron extrayendo a los pacientes, el cociente $CD3^+CD16/56^+CD8^+ / CD3^+CD16/56^+CD8^-$ no variaba significativamente entre los dos grupos de pacientes con melanomas de distinto espesor.

El valor del cociente $CD3^+CD16/56^+CD8^+ / CD3^+CD16/56^+CD8^-$ fue significativamente más elevado ($P < 0,05$) en los pacientes que sobrevivieron ($0,82 \pm 0,54$) que en los que fallecieron ($0,46 \pm 0,15$). El valor más bajo de dicho cociente en los enfermos con menor supervivencia se debía, fundamentalmente, a la menor concentración de células NK $CD8^+$ (tabla XVI; figura 14b). Conviene reseñar que el mencionado cociente fue inferior a 0,75 en todas las muestras extraídas a los pacientes que fallecieron. Un número de células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ inferior a 70 células/ μ L era indicativo de mal pronóstico.

En el grupo NM, la distribución de los dos subtipos de células NK ($CD8^+$ y $CD8^-$) fue similar a la del grupo de supervivientes. Por el contrario, tanto en el grupo MR como en el MV se pudo comprobar un descenso no significativo en el cociente $CD3^+CD16/56^+CD8^+ / CD3^+CD16/56^+CD8^-$, debido sobre todo al mayor número de células NK $CD8^-$ en el grupo MR (figura 15b) y a la concentración más baja de células NK $CD8^+$ en el grupo MV (figura 15a).

Los pacientes de más de 40 años de edad mostraron un cociente $CD3^+CD16/56^+CD8^+ / CD3^+CD16/56^+CD8^-$ más elevado en comparación con el de los enfermos más jóvenes (sin alcanzar diferencias significativas). Estas variaciones eran debidas, fundamentalmente, a que la mayor edad se asociaba con cifras más elevadas de células NK $CD8^+$.

Las células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ fueron las únicas, dentro de todo el estudio, que experimentaron cambios significativos en relación con el sexo del paciente, pues estaban menos representadas en las mujeres que en los hombres ($P < 0,05$). Sin embargo, la concentración de células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ era siempre similar en ambos sexos.

En las figuras 16 y 17 se representa la distinta expresión de las moléculas $CD8$ y $CD16/56$ en los linfocitos de los mismos pacientes que fueron considerados como ejemplo de buena o mala evolución de la enfermedad al tratar la expresión de $CD28$ en células $CD4^+$ y $CD8^+$ (figuras 8 y 9).

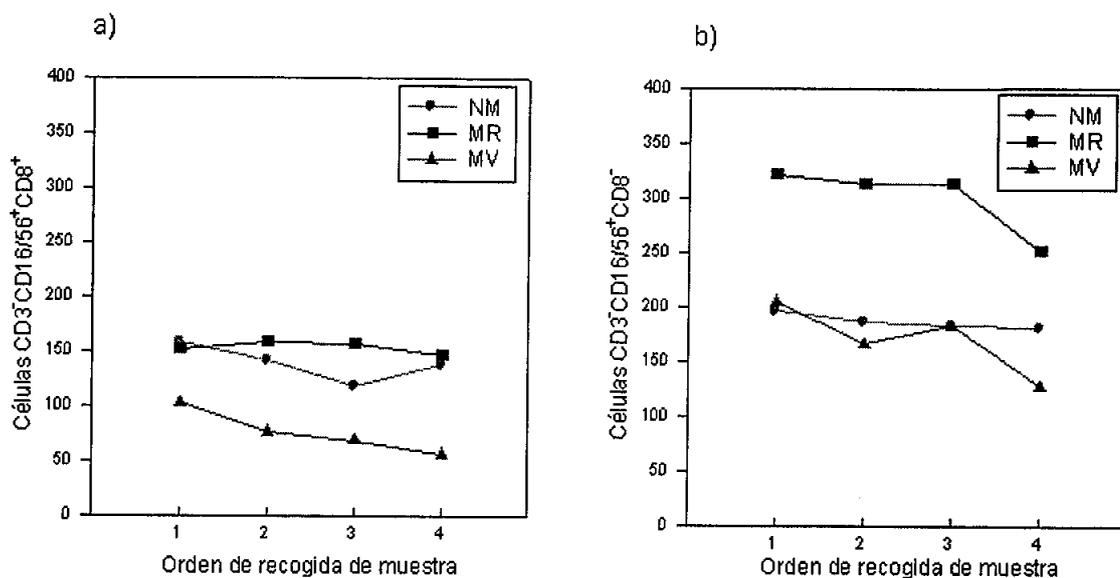


FIGURA 15. Número de células/ μL $\text{CD3}^+\text{CD16/56}^+\text{CD8}^+$ y $\text{CD3}^+\text{CD16/56}^+\text{CD8}^-$ en relación con la aparición de metástasis. El menor número de células NK CD8^+ se daba en el grupo MV (figura 15a) y el mayor número de células NK CD8^- en el grupo MR (figura 15b).

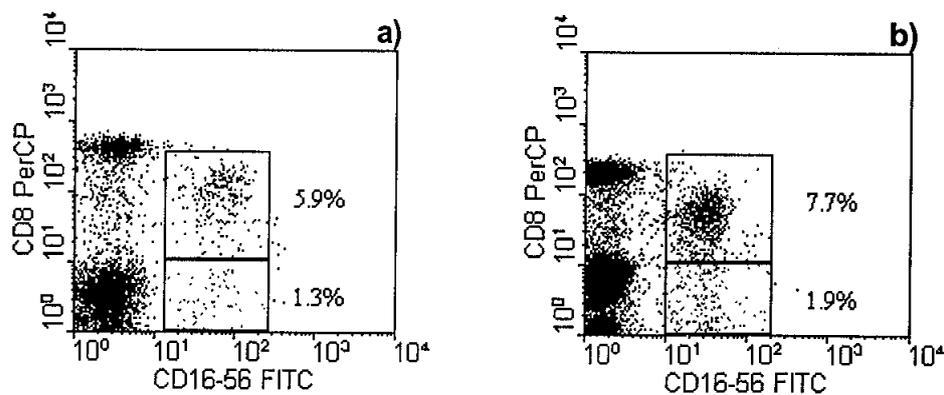


FIGURA 16. Datos obtenidos, por citometría de flujo, de un **paciente prototipo de melanoma de buen pronóstico**. En esta figura se representa la distribución de la expresión de CD8 y CD16/56 en los linfocitos de dicho paciente. Entre las células CD16/56^+ , se puede observar una población que no expresa CD8 y otra que expresa CD8, la cual es mayoritaria. a) y b) representan, respectivamente, la primera y última muestra analizada; las variaciones con el paso del tiempo en la distribución de la expresión de CD8 y CD16/56 fueron mínimas.

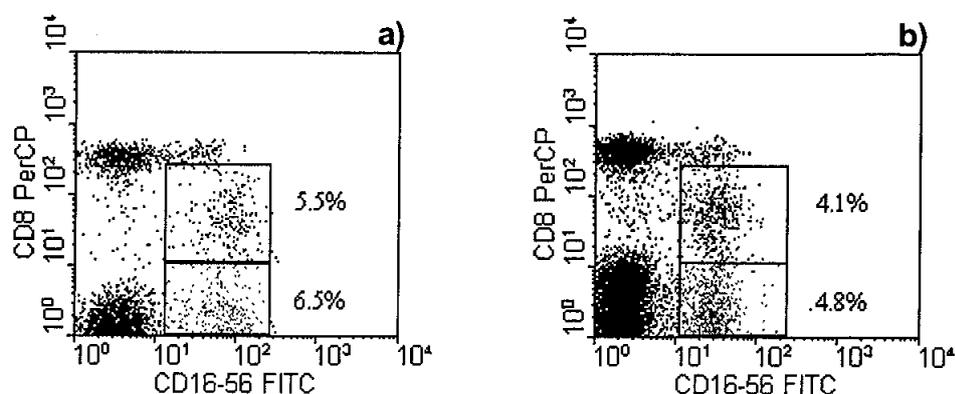


FIGURA 17. Datos obtenidos, por citometría de flujo, de un **paciente prototipo de melanoma de mal pronóstico**. En esta figura se representa la distribución de la expresión de CD8 y CD16/56 en los linfocitos de dicho paciente.

a) En la primera muestra obtenida, las células CD16/56⁺ que no expresan CD8 suponen un número equivalente o superior a las que expresan CD8. Esto contrasta con el resultado del paciente de buen pronóstico. b) En la última muestra recogida, se conserva aproximadamente la misma distribución en la expresión de CD8 por parte de las células CD16/56⁺.

3.1.2.4. Células CD14⁺CD40⁺ y CD14⁺CD40⁻

En el conjunto total de pacientes, las cifras absolutas de monocitos totales permanecieron prácticamente invariables en el tiempo, mientras que los monocitos que expresaban CD40 descendían de modo progresivo y significativo ($P < 0,05$) (figura 18). Esta evolución descendente de las cifras de monocitos CD40⁺ fue más evidente en el grupo de enfermos que fallecieron que en los que sobrevivieron ($P = 0,127$) (tabla XVIII).

Globalmente, no se apreciaron diferencias significativas en la cifra media de monocitos CD40⁺ en relación con el espesor tumoral o la supervivencia.

En el momento basal, el número de células CD14⁺CD40⁺ era más elevado en los dos grupos que desarrollaron metástasis que en el grupo NM, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas (ver figura 19). Sin embargo, la concentración media de estas células sí fue bajando a lo largo del tiempo significativamente en los grupos MR y MV ($P < 0,005$), hasta igualarse con la concentración media del grupo NM (tabla XIX y figura 19).

La mayor o menor edad del paciente no se relacionaba con ningún cambio en la concentración de células $CD14^+CD40^+$ (figura 15).

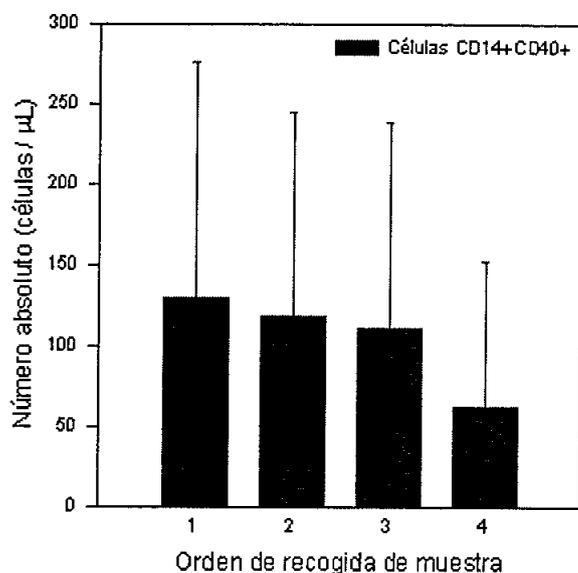
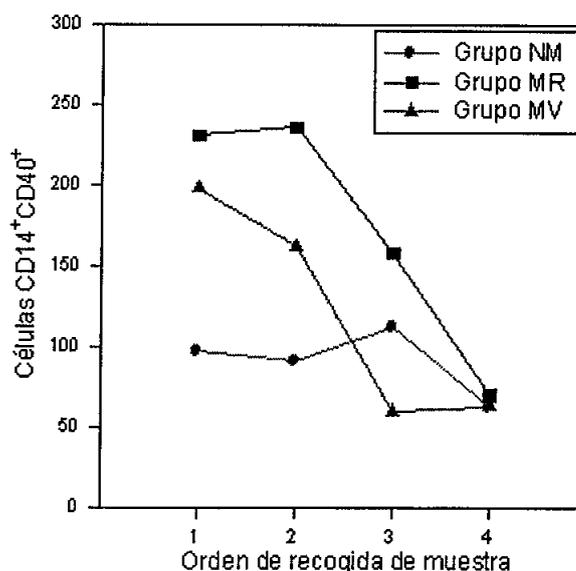


FIGURA 18. Evolución en el tiempo del número absoluto de células $CD14^+CD40^+$ en el total de pacientes de la serie. Se produjo un descenso significativo y progresivo de las cifras de estas células ($P < 0,05$).

FIGURA 19. Evolución en el tiempo de la concentración de células $CD14^+CD40^+$ (células/μL) en los distintos grupos de pacientes en función de la aparición de metástasis. Aunque, al inicio del estudio, las cifras de esta subpoblación eran más altas en los grupos de enfermos que desarrollaron metástasis, transcurridos 18 meses, se igualaron los valores medios de dichas células en todos los enfermos, con independencia de la aparición o no de metástasis.



Cuando se estudió, en el total de pacientes, la evolución de la expresión de $CD40$ en las células $CD14^-$ (de estirpe no monocitaria), se comprobó que, a diferencia de lo observado para los monocitos, la concentración media de células $CD14^-CD40^+$ no se modificaba, en sentido ascendente ni descendente, a lo largo

del tiempo. Tampoco hubo cambios significativos en las cifras de estas células en relación con el espesor o la supervivencia (tabla XVIII). Por el contrario, con el transcurso de los meses, la concentración de células CD14⁻CD40⁺ descendía de modo significativo en el grupo MR ($P<0,01$) frente a los grupos NM y MV, los cuales mantenían una concentración más estable y elevada de dichas células (tabla XIX).

A diferencia de lo observado en el caso de los monocitos CD40⁺, donde no había cambios de su concentración en relación con la edad, las cifras globales de linfocitos CD14⁻CD40⁺ fueron más altas en los sujetos menores de 40 años que en los de edad más avanzada ($P=0,031$).

El análisis de las células CD14⁻CD40⁺, resultó especialmente interesante cuando se estudió la intensidad de expresión de moléculas HLA de clase I sobre dichas células. Así, se pudieron distinguir dos subtipos celulares, según la intensidad de expresión de HLA de clase I fuera alta o baja (CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} o CD14⁻CD40⁺HLA-I^{bajo} respectivamente). Tanto en el conjunto total de pacientes con melanoma como en los distintos grupos de enfermos estudiados, la concentración de células CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} era inferior a la de células CD14⁻CD40⁺HLA-I^{bajo}.

A) Células CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto}.

Las cifras globales de esta subpoblación no variaron significativamente en función del espesor del melanoma. Sin embargo, sí fueron más altas y constantes en el grupo de supervivientes que en los enfermos que fallecieron ($P=0,013$) (tabla XVIII y figura 20a). En estos últimos, a pesar de todo, se demostró un incremento significativo de células CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} en la última muestra obtenida ($P<0,05$), aunque sin llegar a igualar las cifras de los supervivientes (tabla XVIII y figura 20a).

Al comparar los distintos grupos de pacientes según la aparición de metástasis, se observaron variaciones significativas en cuanto a la evolución en el tiempo de las cifras medias de la población CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} ($P<0,001$). En el grupo NM, el número medio de estas células apenas varió entre la primera y la última muestra, y fue siempre superior al número medio de dichas células en los

grupos MR y MV, en los cuales se observó gradualmente un leve descenso y un ligero ascenso, respectivamente (tabla XIX y figura 21a).

La población $CD14^-CD40^+HLA-I^{alto}$ era más numerosa en los pacientes menores de 40 años que en los de mayor edad ($P<0,05$).

B) Células $CD14^-CD40^+HLA-I^{bajo}$

Las cifras globales de estas células no se modificaron en relación con el espesor ni, a diferencia de las $CD14^-CD40^+HLA-I^{alto}$, tampoco en relación con la supervivencia (tabla XVIII y figura 20b). Por el contrario, la población $CD14^-CD40^+HLA-I^{bajo}$ sí variaba significativamente a lo largo del tiempo dependiendo del desarrollo o no de metástasis ($P<0,05$). Tal como ocurría con las células $CD14^-CD40^+HLA-I^{alto}$, las cifras medias iniciales y finales de las células $CD14^-CD40^+HLA-I^{bajo}$ apenas variaron en el grupo NM. Sin embargo, se produjo una caída progresiva, a partir del primer año de seguimiento, en el número medio de células $CD14^-CD40^+HLA-I^{bajo}$ en los grupos MV y MR (tabla XIX y figura 21b).

En contraste a lo observado con la determinación basal del cociente $CD14^-CD40^+HLA-I^{alto} / CD14^-CD40^+HLA-I^{bajo}$ (significativamente más elevado en los enfermos que sobrevivieron), cuando se estudiaron los cambios globales de dicho cociente no se pudieron establecer diferencias significativas intergrupo.

A diferencia de las cifras medias de la población $CD14^-CD40^+HLA-I^{alto}$ (significativamente más altas en los pacientes más jóvenes), los valores medios de las células $CD14^-CD40^+HLA-I^{bajo}$ no se modificaban significativamente con la edad del paciente (tabla XV).

En cuanto a la expresión de CD40L, tal como ocurría en las muestras basales, no se detectaron células positivas para dicho marcador en las sucesivas extracciones realizadas a cada paciente.

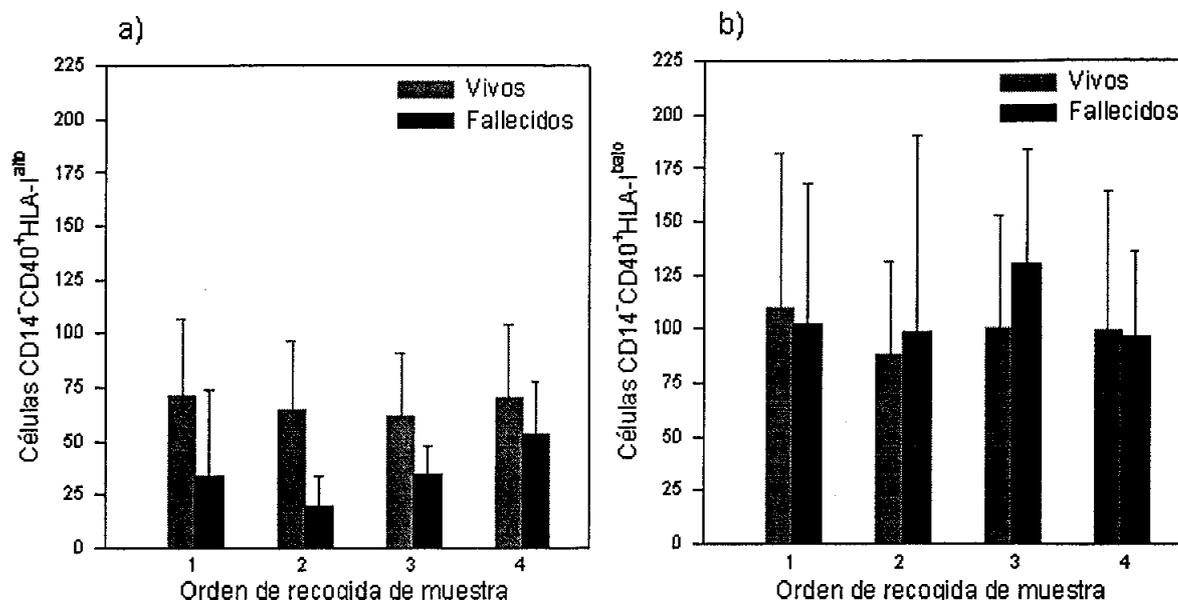


FIGURA 20. Comparación, en relación con la supervivencia, de la evolución de los valores absolutos de células CD14⁺CD40⁺ con alta intensidad de expresión de HLA de clase I (células/μL) (figura 20a), y con baja intensidad de expresión de dicha molécula (figura 20b).

En a) se aprecia la menor concentración de células CD14⁺CD40⁺HLA-I^{alto} en los enfermos que fallecieron con respecto a los que sobrevivieron ($P=0,013$). En b) se puede ver que la concentración de células CD14⁺CD40⁺HLA-I^{bajo} no variaba significativamente en relación con la supervivencia del enfermo.

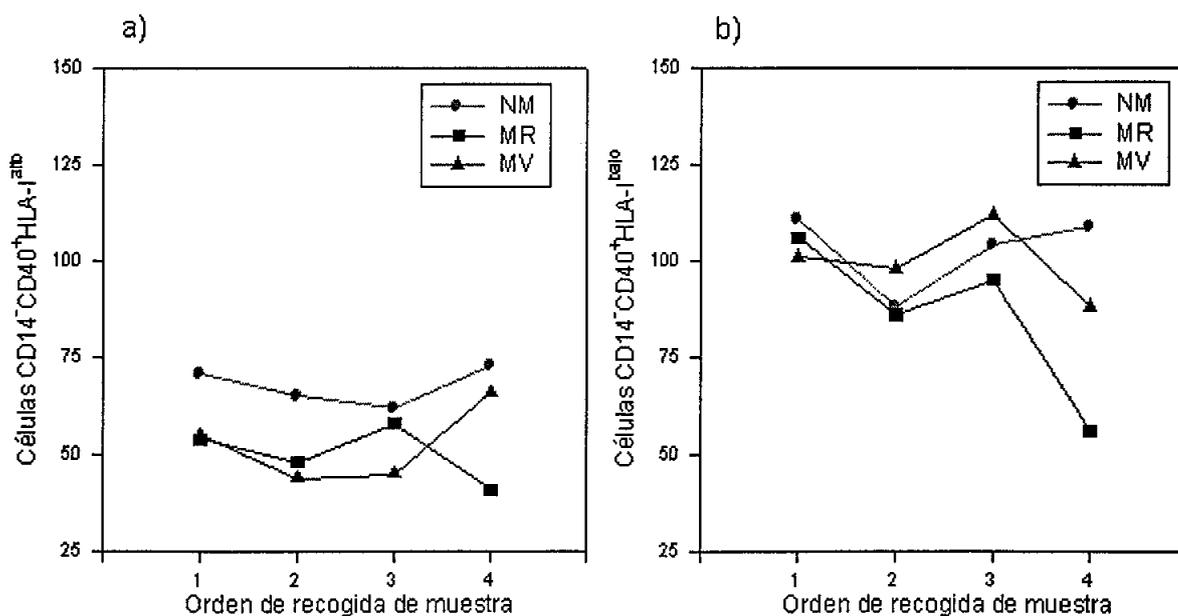


FIGURA 21. Comparación, en relación con la aparición de metástasis, de la evolución de los valores absolutos de células CD14⁺CD40⁺ con alta densidad de expresión de HLA de clase I (células/μL) (figura 21a), y con baja densidad de expresión de dicha molécula (figura 21b).

3.2. Estudio de los niveles séricos de citoquinas

Las citoquinas estudiadas en suero fueron, por una parte IL-15 e INF γ , como integrantes del fenotipo Th1 y, dentro de las citoquinas incluidas en el fenotipo Th2, IL-6 e IL-10. Los análisis de sus valores medios (expresados en pg/mL), se exponen con el mismo criterio que se utilizó para las poblaciones celulares, es decir, primero los relativos a las muestras basales y después los que engloban a todo el periodo de seguimiento.

3.2.1. Determinación de citoquinas séricas en las muestras basales

El estudio fue dirigido a determinar si los valores séricos iniciales de citoquinas podían ser útiles para ayudar a clasificar y predecir la evolución posterior de los pacientes. La determinación de los niveles basales de citoquinas de tipo Th1, INF γ e IL-15, no reflejó modificaciones sensibles entre los distintos grupos de pacientes (tablas XX y XXI). Por el contrario, los datos obtenidos para las citoquinas de tipo Th2, IL-6 e IL-10, demostraban que mientras los niveles basales de IL-6 no diferían significativamente entre los diversos grupos de enfermos, los de la IL-10 sí que variaban (tabla XX y XXI). En este sentido se pudo observar que los niveles basales de IL-10 estaban más altos en el grupo de enfermos que fallecieron que en los que sobrevivieron, de modo que las diferencias llegaban a rozar la significación estadística ($P=0,053$). Además, la cifra media inicial de IL-10 resultó ser significativamente más alta en el grupo MV que en los grupos MR ($P=0,01$) y NM ($P=0,02$).

3.2.2. Cambios globales experimentados por las citoquinas séricas

Como en el caso de las determinaciones basales, se estudiaron por separado las citoquinas de fenotipo Th1 y Th2.

3.2.2.1. $INF\gamma$ e IL-15

Como ocurría con los valores basales de estas citoquinas, tampoco aquí se pudieron demostrar diferencias al comparar los niveles medios de $INF\gamma$ e IL-15 para ningún grupo de estudio a lo largo de todo el periodo de seguimiento (tablas XX y XXI).

3.2.2.2. IL-6 e IL-10

Los niveles séricos de IL-6 se modificaron de modo distinto a lo largo del tiempo en el grupo de enfermos que finalmente fallecieron, en comparación con los supervivientes ($P < 0,01$). Mientras que en estos últimos, las cifras medias de IL-6 permanecieron bastante estables en el tiempo, los individuos que fallecieron experimentaron un aumento en los niveles medios de dicha citoquina al final del periodo de seguimiento (tabla XX y figura 22).

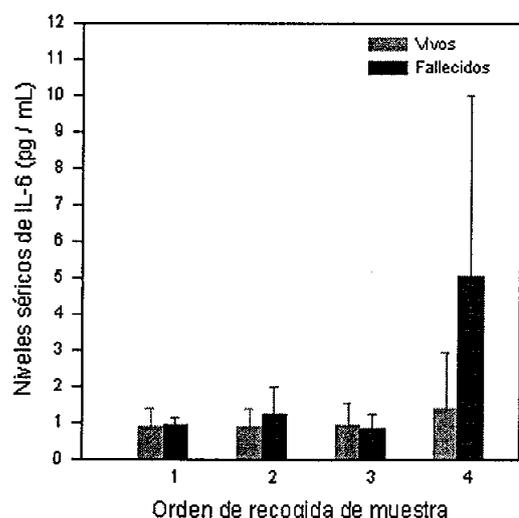


FIGURA 22. Niveles séricos de IL-6 (pg/mL) en pacientes vivos vs fallecidos. En la última muestra, se aprecia un incremento del nivel medio de IL-6 en el grupo de enfermos que fallecieron.

Globalmente, los niveles séricos de IL-6 no se modificaron significativamente en relación con el espesor del tumor (tabla XX) o la aparición de metástasis (tabla XXI). No obstante, y como parece lógico, en consonancia con lo ya descrito en el grupo de enfermos que fallecieron, las cifras medias de IL-6 tendieron a aumentar en las últimas muestras de los pacientes del grupo MV.

En cuanto a la edad y el sexo, no afectaban significativamente a los niveles de IL-6 (datos no mostrados).

Los niveles séricos de IL-10 no variaron mucho en relación con el espesor de Breslow. Curiosamente, sí se observó un descenso significativo de las cifras de IL-10 en el grupo de pacientes que fallecieron ($P < 0,05$). También fueron significativas las modificaciones experimentadas por los niveles medios de IL-10 al comparar los tres grupos NM, MR y MV entre sí ($P < 0,01$), destacando un crecimiento gradual de dichos niveles en el grupo MR, mientras que en los pacientes del grupo MV o NM, decrecían o se mantenían constantes, respectivamente. Curiosamente, transcurrido el primer año de evolución, los niveles séricos medios de IL-10 se igualaban en los tres grupos mencionados (figura 23).

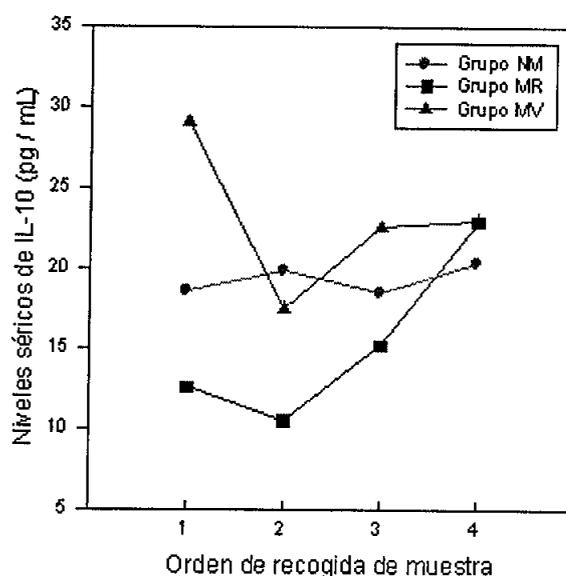


FIGURA 23. Evolución de los niveles séricos de IL-10 en función de la aparición de metástasis (grupos NM, MR y MV).

La IL-10 mantuvo valores bastante estables en relación con la edad y el sexo de los pacientes (datos no mostrados).

TABLA XX. Niveles séricos de INF γ , IL-15, IL-6 e IL-10 (pg/mL) con respecto al espesor de Breslow (≤ 2 mm vs > 2 mm) y a la supervivencia de los pacientes.

	INF-gamma		IL-15	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	15,5 \pm 9,5	13,1 \pm 6,1	4,0 \pm 1,2	4,2 \pm 1,7
6 m	16,0 \pm 17,4	10,8 \pm 5,1	3,4 \pm 0,9	3,6 \pm 1,4
12 m	11,9 \pm 11,9	12,2 \pm 7,6	3,7 \pm 1,2	3,5 \pm 1,5
18 m	20,1 \pm 18,1	13,6 \pm 5,5	4,0 \pm 1,5	3,9 \pm 1,8
Total	15,9 \pm 14,7	12,4 \pm 6,1	3,8 \pm 1,2	3,8 \pm 1,6
	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido
Basal	14,7 \pm 8,6	12,0 \pm 2,5	4,0 \pm 1,4	4,8 \pm 1,2
6 m	14,1 \pm 14,2	9,8 \pm 2,2	3,4 \pm 1,2	3,7 \pm 1,1
12 m	11,8 \pm 10,3	13,5 \pm 9,4	3,6 \pm 1,4	3,5 \pm 1,0
18 m	17,7 \pm 14,9	12,8 \pm 4,3	4,0 \pm 1,7	3,8 \pm 1,4
Total	14,6 \pm 12,3	12,0 \pm 5,1	3,8 \pm 1,4	3,9 \pm 1,2
	IL-6		IL-10	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	0,8 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4	17,8 \pm 10,0	21,4 \pm 8,8
6 m	0,9 \pm 0,6	0,9 \pm 0,4	20,8 \pm 16,7	15,6 \pm 4,7
12 m	1,0 \pm 0,7	0,8 \pm 0,3	18,1 \pm 10,8	19,4 \pm 7,7
18 m	1,4 \pm 1,8	2,3 \pm 2,9	22,9 \pm 16,0	18,9 \pm 8,2
Total	1,0 \pm 1,0	1,3 \pm 1,6	19,9 \pm 13,6	18,8 \pm 7,6
	Vivo	Fallecido	Vivo	Fallecido
Basal	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	18,3 \pm 8,9	28,1 \pm 10,9
6 m	0,8 \pm 0,5	1,2 \pm 0,7	18,4 \pm 13,5	18,5 \pm 7,7
12 m	0,9 \pm 0,5	0,8 \pm 0,4	18 \pm 8,8	23,8 \pm 13,5
18 m	1,3 \pm 1,5	5,0 \pm 4,9	21,6 \pm 13,8	17,5 \pm 3,6
Total	1,0 \pm 0,9	2,0 \pm 2,8	19,1 \pm 11,4	21,9 \pm 9,7

TABLA XXI. Niveles séricos de INF γ , IL-15, IL-6 e IL-10 (pg/mL) con respecto a la aparición de metástasis (grupos NM vs MR vs MV).

	INF-gamma			IL-15		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	14,7 \pm 8,6	10,8 \pm 3,9	15,8 \pm 8,7	4,1 \pm 1,5	3,7 \pm 1,1	4,6 \pm 1,1
0 m	14,8 \pm 15,5	10,5 \pm 4,3	10,6 \pm 2,5	3,6 \pm 1,2	2,8 \pm 0,5	3,5 \pm 1,1
12 m	12,2 \pm 11,2	9,5 \pm 3,8	13,5 \pm 8,2	3,7 \pm 1,5	3,5 \pm 0,9	3,4 \pm 0,8
18 m	17,4 \pm 15,3	17,7 \pm 15,9	15,3 \pm 6,5	4,1 \pm 1,8	3,4 \pm 0,7	3,6 \pm 1,3
Total	14,8 \pm 12,9	12,1 \pm 8,4	13,8 \pm 6,7	3,9 \pm 1,5	3,3 \pm 0,8	3,8 \pm 1,1
	IL-6			IL-10		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,6	0,9 \pm 0,1	18,6 \pm 8,9 •	12,6 \pm 2,7 •	29,1 \pm 9,7 •
0 m	0,9 \pm 0,5	0,9 \pm 0,5	1,1 \pm 0,6	19,9 \pm 14,3	10,5 \pm 3,2	17,5 \pm 7,0
12 m	1,0 \pm 0,6	0,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	18,5 \pm 9,2	15,2 \pm 7,2	22,6 \pm 12,0
18 m	1,3 \pm 1,5	1,9 \pm 2,2	4,2 \pm 4,6	20,4 \pm 12,2	22,9 \pm 21,4	23 \pm 12,7
Total	1,0 \pm 0,8	1,1 \pm 1,1	1,7 \pm 2,6	19,3 \pm 11,2	15,3 \pm 11,3	23 \pm 10,6

•, P<0,05 (diferencias significativas de los niveles séricos basales de la IL-10 entre los pacientes de los grupos MV vs NM, y MV vs MR).

3.3. Estudio del polimorfismo de citoquinas.

Como complemento del estudio de los niveles séricos de citoquinas, se analizó el polimorfismo en los genes reguladores de la síntesis de las citoquinas estudiadas, excepto el de la IL-15 por falta de disponibilidad.

3.3.1. Polimorfismo de interferón- γ

El punto de mutación que determina el polimorfismo del gen regulador de la secreción de INF γ se encuentra en la posición +874 del intron 1, donde puede aparecer una adenina (A) o una timina (T). De acuerdo a esto, pueden existir individuos homocigotos, A/A o T/T, y heterocigotos, T/A.

Tras analizar el polimorfismo del $INF\gamma$ en los pacientes de esta serie, no se demostraron diferencias significativas entre distintos grupos de enfermos (tabla XXII). El genotipo T/A, correspondiente al fenotipo de secreción intermedia de $INF\gamma$, era el más prevalente en el total de enfermos, seguido en orden decreciente de frecuencia por el genotipo T/T, de secreción alta y, en último lugar, por el genotipo A/A, de secreción baja. El genotipo T/A seguía siendo el más representado en los distintos grupos de pacientes definidos en relación con el espesor del tumor, la supervivencia y la aparición de metástasis (en el grupo MR, igualado con el fenotipo T/T). No se detectaron individuos con baja capacidad de secreción de $INF\gamma$ en los grupos MR y MV. El fenotipo alto secretor de $INF\gamma$ estaba menos representado en el grupo MV que en el MR.

TABLA XXII. Polimorfismo en la posición +184 del intrón 1 del $INF\gamma$.

INTRON 1 $INF\gamma$ (+674)	ESPESOR		SUPERVIVENCIA	
	≤ 2 mm	> 2 mm	Vivo	Fallecido
T/T (alto)	5 (27,8%)	6 (40%)	10 (34,5%)	1 (25%)
T/A (intermedio)	11 (61,1%)	7 (46,7%)	15 (51,7%)	3 (75%)
A/A (bajo)	2 (11,1%)	2 (13,3%)	4 (13,8%)	0 (0%)
Total	18 (100%)	15 (100%)	29 (100%)	4 (100%)
INTRON 1 $INF\gamma$ (+874)	GRUPOS SEGUN METASTASIS			PACIENTES (TOTAL)
	NM	MR	MV	
T/T (alto)	8 (33,3%)	2 (50%)	1 (20%)	11 (33,3%)
T/A (intermedio)	12 (50%)	2 (50%)	4 (80%)	18 (54,5%)
A/A (bajo)	4 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (12,1%)
Total	24 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	33 (100%)

En esta tabla, se recoge el número (absoluto y relativo) de pacientes que expresan cada genotipo, agrupados con respecto al espesor tumoral, la supervivencia y la aparición de metástasis. También se representa la distribución de genotipos en el total de enfermos de la serie (parte inferior derecha).

3.3.2. Polimorfismo de IL-6

El polimorfismo en la expresión del gen regulador de la secreción de IL-6 se sitúa en la posición -174 de la porción proximal de su promotor, donde puede existir una guanina (G) o una citosina (C). De acuerdo a esto, pueden existir individuos homocigotos, G/G o C/C, y heterocigotos, G/C. Los sujetos de genotipo G/G o G/C son considerados de fenotipo alto secretor de IL-6, mientras que el genotipo C/C ocasiona un fenotipo bajo secretor de dicha citoquina.

TABLA XXIII. Polimorfismo en la posición -174 del promotor de la IL-6.

PROMOTOR IL-6 (- 174)	ESPESOR		SUPERVIVENCIA	
	≤ 2 mm	> 2 mm	Vivo	Fallecido
G/G (alto)	7 (38,9%)	4 (26,7%)	11 (37,9%)	0 (0%)
G/C (alto)	11 (61,1%)	11 (73,3%)	18 (62,1%)	4 (100%)
C/C (bajo)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	18 (100%)	15 (100%)	29 (100%)	4 (100%)
PROMOTOR IL-6 (- 174)	GRUPOS SEGÚN METÁSTASIS			PACIENTES TOTALES
	NM	MR	MV	
G/G (alto)	9 (37,5%)	2 (50%)	0 (0%)	11 (33,3%)
G/C (alto)	15 (62,5%)	2 (50%)	5 (100%)	22 (66,7%)
C/C (bajo)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	24 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	33 (100%)

En la tabla superior se indica el número (absoluto y relativo) de pacientes que expresan cada genotipo, agrupados con respecto al espesor tumoral, la supervivencia y la aparición de metástasis. También se representa la distribución de genotipos en el total de enfermos de la serie (parte inferior derecha).

En los pacientes estudiados en esta serie, no se demostraron diferencias significativas al analizar el polimorfismo de la IL-6 (tabla XXIII). Todos los enfermos pertenecían al fenotipo secretor alto de IL-6, aunque se apreció un predominio de los heterocigotos sobre los homocigotos, tanto en el conjunto total de pacientes como en los dos grupos creados en función del espesor tumoral. La totalidad de enfermos que fallecían eran heterocigotos (G/C), mientras que esta

característica sólo la presentaban el 62% de los que permanecían vivos al final del estudio ($P=0,17$). Igualmente, fueron heterocigotos todos los pacientes del grupo MV. La frecuencia de individuos homocigotos y heterocigotos en el grupo NM era similar a la que existía entre los pacientes que sobrevivían.

3.3.3. Polimorfismo de IL-10

El polimorfismo en el gen regulador de la secreción de la IL-10 es más complejo, ya que afecta a tres posiciones del promotor (-1082, -819 y -592), dando lugar a 6 genotipos distintos y originando tres fenotipos de secreción (tabla XXIV).

La mayoría de pacientes estudiados pertenecían al fenotipo de secreción intermedia de IL-10 (54,5%); por el contrario, el fenotipo secretor alto era el menos frecuente (9,1%) (tabla XXIV).

No se observaron diferencias significativas en cuanto al fenotipo secretor de IL-10 entre los distintos grupos de espesor, supervivencia o metástasis (tabla XXIV). No obstante, no se encontró ningún secretor alto de IL-10 entre los pacientes que fallecieron, en los cuales predominaba el fenotipo secretor bajo de dicha citoquina (75%). Sin embargo, este último fenotipo estaba mucho menos representado en los individuos que sobrevivieron (31%).

En ningún paciente con metástasis se encontró el genotipo que favorece la producción elevada de IL-10 (GCC/GCC). Dicho genotipo se limitaba al grupo NM. La prevalencia de los genotipos que condicionan baja expresión de IL-10 era progresiva para los grupos NM, MR y MV (29,2%, 50% y 60% respectivamente).

En contraste con la falta de datos significativos al comparar los distintos grupos de enfermos en función del fenotipo productor de IL-10, sí se demostró una correlación significativa entre el genotipo del promotor de la IL-10 y la supervivencia del enfermo. En concreto, el **genotipo ACC/ATA** se correlacionó de modo significativo con un peor pronóstico vital del melanoma que el resto de genotipos ($P=0,02$), pues de los siete pacientes que presentaban dicho genotipo, tres fallecieron antes de los 30 meses (tabla XXIV y figura 24). Dentro del grupo de enfermos con melanomas de más de 2 mm de espesor, el genotipo ACC/ATA

también se asociaba con mayor número de fallecimientos, aunque sin llegar a alcanzar significación estadística dicha asociación ($P=0,07$) (tabla XXIV).

TABLA XXIV. Polimorfismo de IL-10 con respecto al espesor tumoral, la supervivencia y la aparición de metástasis, y para el total de enfermos.

GENOTIPO promotor (- 1082, - 819, - 592)	ESPESOR		SUPERVIVENCIA	
	≤ 2 mm	> 2 mm	Vivo	Fallecido *
GCC/GCC (a)	2 (11,1%)	1 (6,7%)	3 (10,3%)	0 (0%)
GCC/ACC (i)	4 (22,2%)	4 (26,7%)	7 (24,1%)	1 (25%)
GCC/ATA (i)	7 (38,9%)	3 (20%)	10 (34,5%)	0 (0%)
ACC/ACC (b)	3 (16,7%)	1 (6,7%)	4 (13,8%)	0 (0%)
ACC/ATA (b) *	2 (11,1%)	5 (33,3%)	4 (13,8%)	3 (75%)
ATA/ATA (b)	0 (0%)	1 (6,7%)	1 (3,4%)	0 (0%)
Total	18 (100%)	15 (100%)	29 (100%)	4 (100%)
GENOTIPO promotor (- 1082, - 819, - 592)	GRUPOS SEGÚN METÁSTASIS			PACIENTES TOTALES
	NM	MR	MV	
GCC/GCC (a)	3 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (9,1%)
GCC/ACC (i)	5 (20,8%)	2 (50%)	1 (20%)	8 (24,2%)
GCC/ATA (i)	9 (37,5%)	0 (0%)	1 (20%)	10 (30,3%)
ACC/ACC (b)	3 (12,5%)	1 (25%)	0 (0%)	4 (12,1%)
ACC/ATA (b)	3 (12,5%)	1 (25%)	3 (60%)	7 (21,2%)
ATA/ATA (b)	1 (4,2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)
Total	24 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	33 (100%)

Fenotipos de secreción de IL-10: (a), alto; (i), intermedio; (b), bajo.

*, correlación significativa entre el genotipo ACC/ATA y el fallecimiento del enfermo ($P=0,02$).

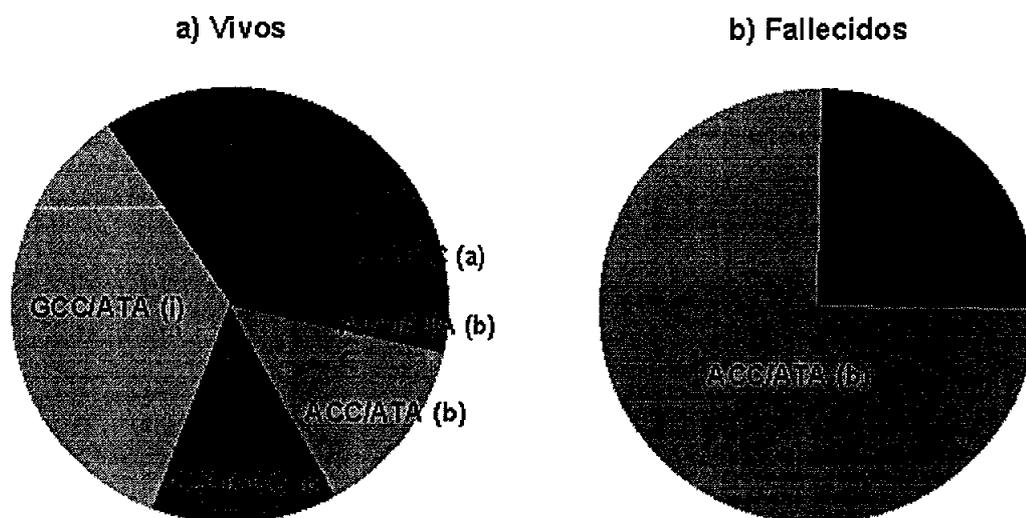


FIGURA 24. Representación de la prevalencia de los distintos polimorfismos en el promotor de la IL-10, con respecto a la supervivencia. Nótese el claro predominio del genotipo ACC/ATA (asociado a fenotipo secretor bajo de IL-10) entre los enfermos que fallecieron en los primeros 30 meses, lo cual contrasta con la menor representación de dicho genotipo entre los pacientes que permanecían vivos tras dicho periodo de seguimiento. Además, el genotipo GCC/GCC (asociado a fenotipo secretor alto de IL-10) sólo se encuentra representado entre los individuos que sobrevivieron más de 30 meses.

Fenotipo de secreción de IL-10: (a), alto; (i), intermedio; (b), bajo.

V. DISCUSIÓN

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE LOS MELANOMAS

En lo que se refiere a las características propias del individuo analizadas en este trabajo, dado que en la selección de pacientes no se tuvo en cuenta ni el sexo ni la edad, la distribución de los enfermos de esta serie en relación con estos dos parámetros podría estar reflejando lo que ocurre en la población general. Como se ha señalado en el capítulo de antecedentes, se estima que el melanoma presenta la misma incidencia en mujeres que en hombres, lo cual se ha cumplido en la serie de enfermos aquí estudiada. Y como han descrito otros autores, la localización más frecuente del tumor han sido las extremidades inferiores en las mujeres, y el tronco en los hombres (*Crombie, 1981*).

En nuestra serie, los tumores situados en el tronco y los de localización acral fueron los de mayor espesor, lo cual podría explicarse por estar en zonas menos visibles, con lo cual el diagnóstico sería menos precoz y el tumor tendría más tiempo para aumentar de grosor, hipótesis ya propuesta por otros autores (*Salman y Rogers, 1990*).

Diversos trabajos han mostrado que, en el caso del melanoma, el sexo femenino puede considerarse como un factor pronóstico independiente de la edad y localización de la lesión primaria, así como independiente del espesor tumoral y el estadio clínico de la enfermedad (*Sondergaard y Schou, 1985; Clark y cols, 1989; Cochran y cols, 2000*). De hecho, incluso se ha llegado a apuntar un posible papel de las hormonas sexuales esteroideas en un comportamiento aparentemente más benigno de los melanomas en la mujer (*Vossaert y cols, 1992; Miller y Neil, 1997*). En la serie aquí estudiada, aunque se han encontrado diferencias entre hombres y mujeres, en el sentido de una mayor supervivencia en estas últimas, dichas diferencias no han resultado significativas. De cualquier modo, el espesor medio de los melanomas incluídos en este trabajo ha sido menor en las mujeres que en los hombres, por lo que aunque las diferencias de supervivencia hubieran resultado significativas, no se hubiera podido descartar que fueran debidas a la influencia del espesor. No obstante, cabría la posibilidad de que la supuesta mejor evolución del melanoma en el sexo femenino fuera

debida, al menos en parte, a diferencias en el comportamiento del sistema inmunitario entre ambos sexos. En este sentido, si el sistema inmunitario de la mujer se defiende de forma más eficiente frente a las células de melanoma, ello podría contribuir al menor espesor observado en el sexo femenino en nuestra serie. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no apoyan esta idea, ya que no se han demostrado diferencias sustanciales en los parámetros inmunológicos analizados, como se explicará después con más detalle. Es decir, parece que de la diferencia de sexo no se deriva ninguna variación en cuanto al funcionamiento del sistema inmunitario en la lucha antitumoral, por lo menos en el caso del melanoma cutáneo.

Con respecto a la edad, la mayoría de los estudios multivariantes no le han concedido un valor pronóstico independiente, pues la han ligado directamente al mayor espesor tumoral (*Popescu y cols., 1990*), aunque algunos autores han señalado que el pronóstico empeora en sujetos mayores de 60 años (*Cochran y cols., 2000*). En nuestra serie, la edad más avanzada del individuo se asoció con un peor pronóstico, pues todos los pacientes fallecidos pertenecían al grupo de más de 40 años de edad. Sin embargo, no se puede atribuir solamente al espesor tumoral esta distinta evolución observada en relación con la edad del paciente, pues no se han encontrado diferencias ostensibles en cuanto al espesor de Breslow entre los dos grupos de edad considerados.

Es un hecho constatado que, en general, la inmunidad del individuo decae con la senescencia (*Potestio y cols, 1999*). Por ello, y de modo análogo a como se ha apuntado previamente en el caso del sexo, también se podría pensar que, al menos en los grupos de mayor edad, el supuesto peor comportamiento del melanoma podría ser secundario, por lo menos en parte, a deficiencias en el sistema inmunitario del paciente. A este respecto, y en cuanto a los resultados inmunológicos, en la serie aquí estudiada se han podido obtener más datos interesantes en relación con la edad que con el sexo. En este sentido, como se discutirá más adelante, ciertas diferencias o variaciones en las variables inmunológicas estudiadas en esta tesis, podrían justificarse por la diferente edad de los pacientes. Pero otras diferencias observadas, no parecen verse influenciadas por este concepto.

La tasa de supervivencia a los 30 meses, observada en nuestra serie, ha sido del 87,9%, lo cual se puede considerar superponible a lo descrito en la

literatura para los pacientes con melanoma, sin distinción de espesor, en los cuales se ha señalado una supervivencia del 88% a los 24 meses (*Dennis, 1999*).

Aunque algunos autores han señalado que el diagnóstico de melanomas de bajo espesor puede ser responsable parcial del aumento en la incidencia de dicha neoplasia observado en los últimos decenios, en nuestra serie conviene reseñar que la prevalencia de lesiones con menos de 2 mm de espesor fue similar a la de melanomas con mayor espesor. Por tanto, es posible que el aumento descrito en la incidencia global de melanoma se pueda deber al incremento tanto de tumores finos como gruesos, hecho ya apuntado por otros autores (*Swerlick y Chen, 1997*).

En el presente estudio, como cabía esperar, tanto las metástasis viscerales como los fallecimientos ocurrieron entre los pacientes que tenían melanomas con mayor espesor. La supervivencia a los 30 meses fue del 73,3% para los pacientes con melanomas de más de 2 mm de espesor, dato similar al 73% descrito por Dennis con los melanomas de más de 3 mm de grosor tras 2 años de seguimiento (*Dennis, 1999*).

En cuanto a los diferentes tipos histológicos de los melanomas estudiados, sus correspondientes incidencias fueron similares a lo ya publicado (*Langley y cols, 1999*), con la salvedad del MLA, cuya incidencia fue 5 veces superior, afectando a un 15% del total de enfermos. El MES y el MN fueron los dos tipos histológicos más frecuentes, por ese mismo orden, mientras que el LMM fue el menos representado. Aunque se demostró una correlación entre el MN y el fallecimiento del paciente, si se tiene en cuenta lo descrito en estudios multivariantes, la mayor agresividad del MN sólo se traduce en lesiones de mayor espesor, el cual sí posee valor pronóstico independiente, a diferencia del tipo histológico (*Koh y cols, 1984; Gordon y cols, 1991; Mansson-Brahme y cols, 1994*).

Al analizar la posible correlación entre el resto de variables histológicas consideradas en este trabajo y la supervivencia del enfermo, podría resultar llamativo la falta de correlación entre la supervivencia y la ulceración, característica ésta última a la que se ha concedido gran relevancia en la última clasificación propuesta por el AJCC (*Balch y cols, 2000*) y que se ha descrito que presenta valor pronóstico independiente (*Balch y cols, 1992*) en el caso del

melanoma. Dicha falta de correlación quizás pueda ser debida al tamaño reducido de la serie de casos estudiada.

En cuanto al infiltrado inflamatorio perilesional, parece lógico pensar que la presencia del mismo no necesariamente significa una efectividad en la erradicación del tumor. Pero también parece evidente que si dicho infiltrado está ausente, la capacidad para destruir o, al menos, intentar limitar el crecimiento y circunscribir el tumor, será menor. Los resultados hallados en esta serie así parecen indicarlo, pues todos los fallecimientos ocurrieron en pacientes cuyos melanomas no mostraban signos de infiltrado inflamatorio peritumoral. Por tanto, la ausencia de infiltrado se podría considerar como un marcador de mal pronóstico.

En estudios multifactoriales se ha descrito que la intensidad de la respuesta inflamatoria peritumoral disminuye conforme aumenta el espesor de la lesión (Day y cols, 1982). Por este motivo se le ha negado valor pronóstico independiente al infiltrado inflamatorio que rodea al melanoma (Kopf y cols, 1987). Sin embargo, es posible que el espesor esté, al menos en parte, condicionado por el infiltrado. Es decir, cuando el infiltrado es nulo, la consiguiente incapacidad para limitar el crecimiento del tumor puede permitir que éste alcance un mayor grosor.

Aunque diversos autores, y con diferentes explicaciones, han asociado la regresión histológica con un peor pronóstico (Blessing y McLaren, 1992; Shaw y cols, 1989), en este trabajo no se ha encontrado ninguna correlación significativa entre la regresión y el fallecimiento del enfermo. Por el contrario, en ninguno de los casos donde se produjo el fallecimiento se demostraron signos de regresión en el estudio histológico de la lesión.

La mayoría de autores no coinciden en qué tipo celular se puede correlacionar con el pronóstico del melanoma (Van der Esch y cols, 1981; McGovern y cols, 1981), de donde se ha inferido que el tipo celular no es un marcador pronóstico importante. Sin embargo, el estudio del tipo histológico de los melanomas de esta serie no parece corroborar esta idea, pues el tipo celular que se denominó atípico se correlacionó de modo muy importante con el pronóstico vital. Resultó bastante llamativo el hecho de que casi la mitad de los tumores que mostraban predominio de celularidad atípica provocaban la muerte del huésped portador del tumor antes de los 30 meses del diagnóstico. Según

estos datos, el tipo celular atípico podría considerarse como un marcador predictivo de mala evolución del melanoma.

2. MELANOMA Y SISTEMA INMUNITARIO

En la actualidad, es un hecho comúnmente aceptado que el melanoma es uno de los tumores con mayor capacidad inmunogénica. Esta circunstancia, junto con la mayor facilidad de las células de melanoma para ser adaptadas a estudios experimentales *in vitro*, ha facilitado la definición de un mayor número de antígenos asociados con el melanoma que con otros tumores, así como el análisis de su restricción por el MHC (Nestle y cols, 1999; Houghton y cols, 2001). Todo ello también ha permitido la identificación de células citolíticas efectoras específicas frente al tumor (Boon y cols, 1997; Lee y cols, 1999), y ha facilitado la propuesta y experimentación de nuevas estrategias inmunoterapéuticas mediante el uso de vacunas diseñadas de manera específica (Nielsen y cols, 2000).

En los últimos años, una gran cantidad de estudios han ido dirigidos a definir las características de la célula tumoral que le permiten escapar a la vigilancia inmunológica. Este es el caso de numerosos trabajos relacionados con la pérdida de expresión de moléculas HLA en las células de melanoma (Carrel y cols, 1985; Garrido y cols, 1997). Otros estudios se han centrado en la definición de antígenos propios del tumor y la valoración de su reactividad *in vitro* (Houghton y cols, 2001) o en el análisis del infiltrado celular del tumor (Strohal y cols, 1994; Becker y cols, 1997). Sin embargo, hasta el momento, son más escasos los trabajos encaminados a estudiar la importancia de los cambios sistémicos que tienen lugar en el sistema inmunitario de pacientes con melanoma. Dichos cambios pueden ser reflejo de la capacidad defensiva antitumoral propia de cada individuo, probablemente modulada por elementos derivados de la actividad biológica de las células malignas (Donawho y cols, 2001). Es decir, la capacidad de rechazar o tolerar el tumor puede depender de la predisposición individual para elaborar respuestas inmunitarias antitumorales eficientes o no. Pero además, puede ocurrir una merma en la eficacia del sistema inmunitario normal, a causa de la interacción con células o factores derivados del tumor.

La mayoría de los melanomas primarios se localizan en la piel, órgano en el que la inmunidad es dominada por los linfocitos T, los cuales son mediadores de las respuestas de hipersensibilidad retardada, encuadradas dentro de las respuestas de tipo Th1 (Zierhut y cols, 1996).

Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que tanto las células T CD8⁺ como las CD4⁺ participan en la respuesta inmunitaria frente al melanoma, ejerciendo una actividad citotóxica, restringida por moléculas del MHC de clase I y II respectivamente. No obstante, la participación en dicha respuesta inmunitaria de las células T CD4⁺ puede ser más relevante debido a su papel amplificador de la reactividad inmunológica que a su propia actividad citolítica, sobre todo gracias a la capacidad de secretar citoquinas de tipo Th1, como TNF α e INF γ (Markus et al, 1995). Sin embargo, este tipo de respuesta puede ser modificado por cambios en el microambiente donde se desarrolla el tumor. Así, en el caso del melanoma, la radiación UV puede inducir en los queratinocitos la producción de determinados patrones de citoquinas capaces de impedir la activación de las células T (Houghton y cols, 2001). En este sentido, en estudios experimentales, se ha demostrado que la luz UV favorece la secreción de citoquinas de tipo Th2, como IL-4 y/o IL-10 (Shreedhar y cols, 1998; Beissert y cols, 1999). Por otro lado, puede existir una disminución de la respuesta inmunitaria antitumoral a consecuencia de la anergización de las células T CD4⁺, al ser estimuladas por células tumorales que se comportan como APCs *no profesionales*, en las que la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80 o CD86, es inadecuada (Becker y cols, 1993; Wang, 2001). El resultado final de todas estas interacciones puede ser una insuficiente cooperación de las células T CD4⁺ para inducir células T CD8⁺ citolíticas.

Otras células, aparte de los linfocitos T, como los linfocitos B, los monocitos y las células NK también tienen una función de interés en la respuesta inmunitaria frente a tumores (Ding y Shevach, 1996; Cooper y cols, 2001; Holland y Gallin, 1998). Por este motivo, dichas células también han sido objeto de estudio en este trabajo.

3. MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA.

Las determinaciones basales de las distintas poblaciones celulares en sangre periférica, se llevaron a cabo con la doble finalidad de conocer la situación basal en la que se encontraba el paciente en el momento de la primera consulta e investigar si podía existir algún factor que desde una fase temprana pudiera orientar sobre el pronóstico, y para disponer de unos valores iniciales de referencia sobre los que poder comparar los posibles cambios experimentados por las distintas poblaciones celulares durante la progresión del tumor. Estos estudios constituyeron la primera parte del segundo objetivo planteado en esta tesis.

En general, al comparar los resultados del análisis de las primeras muestras con los de las muestras sucesivas, se observó que el número absoluto de leucocitos, linfocitos y monocitos totales se mantenía prácticamente constante durante todo el periodo de seguimiento en los pacientes con melanoma. Por el contrario, la distribución de algunos subtipos de linfocitos, células NK y monocitos sí experimentó cambios, que en algunos casos resultaron de interés.

Como ya se ha descrito, el envejecimiento del individuo se asocia con alteraciones en su sistema inmunitario, tanto en el número, como en la prevalencia de distintos subtipos y en la capacidad proliferativa de los linfocitos T (Miller, 1996; Potestio y cols, 1999). Así, la denominada inmunosenescencia se asocia con un descenso en el número de los linfocitos T, tanto $CD4^+$ o colaboradores como $CD8^+$ o citotóxicos (Effros, 2000). En nuestra serie, se detectó un descenso de los linfocitos T $CD3^+$, y de sus subtipos $CD8^+$ y $CD4^+$, en los pacientes con mayor edad (ver tabla XV). Sin embargo, estas diferencias en el número de linfocitos T no fueron tan patentes al comparar grupos de enfermos con distinta supervivencia o con melanomas de distinto espesor. Esta información debe ser tenida en cuenta, para no generar confusión, a la hora de evaluar el posible efecto inmunosupresor inducido por el tumor. En los pacientes estudiados en este trabajo, el descenso en el número de linfocitos T en sangre periférica podría estar reflejando el envejecimiento del individuo y de su sistema inmunitario. Es decir, a la vista de nuestros datos, la presencia del melanoma no parece ejercer sobre los linfocitos T $CD3^+$, $CD8^+$ o $CD4^+$ un efecto que supere a los

cambios propios de la edad. Es probable que se requieran largos periodos de contacto entre las células del melanoma y el sistema inmunitario del paciente para que se produzca un descenso en el número de determinadas poblaciones celulares en sangre periférica, en ocasiones equiparable al provocado por la inmunosenescencia.

Si se estudia la relación existente entre el número de algunos subtipos de linfocitos T, como ocurre con el cociente CD4/CD8, la información que se obtiene puede tener mayor poder orientativo sobre el pronóstico del paciente con melanoma que si se analizan por separado dichos subtipos celulares. En nuestros pacientes este cociente no se alteraba con el envejecimiento, ya que la edad del enfermo parecía afectar de la misma forma a los linfocitos CD4⁺ que a los CD8⁺. Sin embargo, al agrupar a los pacientes en función del espesor del melanoma, el valor del cociente CD4/CD8 resultó inversamente proporcional a dicho espesor, es decir, cuanto mayor era el índice de Breslow menor era la relación CD4/CD8. Además, con el transcurso del tiempo, las diferencias en dicho cociente entre los pacientes con melanomas más gruesos y más finos se fueron incrementando, hasta hacerse significativas, observándose un descenso progresivo del mencionado cociente en los pacientes con melanomas de peor pronóstico (mayor grosor) (ver figura 3a).

Algo similar a lo observado con el espesor tumoral, se observó al comparar el cociente CD4/CD8 entre los dos grupos de pacientes creados según la supervivencia a los 30 meses. Aunque en este caso los valores de partida eran prácticamente idénticos en las muestras basales, se produjo una profunda caída después del primer año de seguimiento en los pacientes que posteriormente fallecieron (ver figura 3b). Por tanto, la monitorización del cociente CD4/CD8 podría ofrecer información sobre el grado de malignidad de la enfermedad, de modo que si va descendiendo progresivamente por debajo de 2, puede ser un indicador de mal pronóstico. No obstante, no parece que dicho cociente pueda considerarse un factor con carácter predictivo desde el inicio de la enfermedad.

El descenso observado en el cociente CD4/CD8 en los pacientes con peor evolución, es decir, en los que fallecieron, no parece que tenga su origen en un aumento de la población de linfocitos CD8⁺, sino que más bien parece debido a la pérdida de linfocitos CD4⁺. Esta disminución podría deberse a distintos mecanismos: a) a una sustracción producida por un trasvase de células CD4⁺ al

infiltrado inflamatorio peritumoral; b) a que con la progresión tumoral se liberen factores solubles o citoquinas, como la IL-10, que inhiban el crecimiento de las células CD4⁺ (Taga y cols, 1993); c) a la presencia en la célula tumoral de moléculas capaces de inducir muerte celular por apoptosis, vía CD95/CD95L (Maeda y cols, 1998), o por otra vía independiente de procesos de apoptosis; y d) a una predisposición constitucional de pacientes que sufren melanoma para secretar determinadas citoquinas, o inducir expresión de CTLA-4, que pueden inhibir el crecimiento de linfocitos CD4⁺. En cualquier caso, todas las situaciones anteriores redundarían en una mayor facilidad del paciente establecer tolerancia frente al tumor.

La acción efectora de las células T CD4⁺ sobre tumores es peor conocida que la de las células T CD8⁺, pero cada vez existen más evidencias que subrayan la importancia de los linfocitos T colaboradores en el estímulo de la respuesta inmunitaria antitumoral (Houghton y cols, 2001). Así, se ha revelado la especificidad de los linfocitos T CD4⁺ para el reconocimiento de antígenos de diferenciación melanocítica (Topalian y cols, 1996; Wang y cols, 1999; Wang 2001). Y la falta de respuesta de las células T CD4⁺ específicas frente a un tumor podría ser responsable del fracaso de protocolos de inmunoterapia (Wang, 2001).

Como ya se ha señalado, la acción de los linfocitos CD4⁺ se ha relacionado con la secreción de citoquinas de tipo Th1, contribuyendo a la regresión del tumor a través de mecanismos independientes de la inducción de apoptosis sobre la célula de melanoma (Lowe y cols, 1997; Thomas y cols, 1998). Un ejemplo de ello podría ser el reclutamiento, por parte de los linfocitos T CD4⁺ infiltrantes del tumor, de células efectoras, como es el caso de los macrófagos (Hung y cols, 1998).

4. CAMBIOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CD28 Y MOLÉCULAS COESTIMULADORAS

El reconocimiento de un antígeno por el TcR resulta eficiente cuando se acompaña de segundas señales que contribuyen a estabilizar la denominada *sinapsis inmunológica*. Aunque cada vez se amplía el número de pares de

moléculas que contribuyen a dicha estabilización, en esta memoria se han analizado las señales coestimuladoras más clásicas y mejor conocidas, que implican a las moléculas CD28 y CTLA-4, sobre la célula T, y a sus ligandos de la familia de moléculas B7 (CD80 y CD86), los cuales se expresan normalmente sobre las APCs. Además, se han estudiado otros dos pares de moléculas, el CD95/CD95L y el CD40/CD40L, que se discutirán en el siguiente apartado.

Los datos resultantes de la monitorización del número de células que expresaban la **molécula CD28**, reflejaron que la disminución que experimentaban las células CD4⁺CD28⁺ en los pacientes de mayor edad era similar, en términos absolutos, al descenso que se observaba en los linfocitos CD4⁺ totales en esos mismos individuos (tabla XV). Esto hace pensar que la disminución del número de células CD4⁺ con el envejecimiento debe ser secundaria, sobre todo, a la pérdida de células CD4⁺CD28⁺. Se ha postulado que los cambios fenotípicos en las células T y, en consecuencia, las alteraciones en sus funciones efectoras, pueden explicar muchas de las disfunciones inmunológicas relacionadas con la edad. Entre dichos cambios se encuentra una disminución en la expresión de CD28 sobre las células T CD4⁺ (*Vallejo y cols, 1998*).

En nuestra serie, también se observó una disminución en el número de células CD4⁺CD28⁺ en los pacientes con melanomas de mayor espesor y en los que fallecieron. Dichas diferencias no resultaron significativas para las muestras basales, pero sí al considerar todas las muestras extraídas sucesivamente a cada paciente (valores globales) (ver figura 4). En éste último caso, el nivel de significación fue igual al obtenido para las diferencias observadas en la concentración de células CD4⁺CD28⁺ entre los dos grupos de edad establecidos en este trabajo, consistentes en un descenso de dichas células en los pacientes de mayor edad. Esto quiere decir que los cambios en la concentración de las células CD4⁺CD28⁺ observados en relación con el espesor del tumor o la supervivencia pueden ser debidos, al menos en gran medida, a la diferente edad de los pacientes que pertenecen a cada grupo. Sin embargo, se sabe que tras la activación celular (como la que puede provocar un tumor) pueden aparecer fluctuaciones en la expresión de CD28 sobre las células T CD4⁺ y CD8⁺, en el sentido de un aumento de las células CD28⁺ (*Metzler y cols, 1999*). Por tanto, en el caso de un tumor inmunogénico, como el melanoma, se debería producir activación celular con el consiguiente aumento en el número de células T CD28⁺,

independientemente de los cambios en dicha población relacionados con el normal envejecimiento del individuo. No obstante, es probable que el número de replicaciones inducidas sobre las células CD4⁺CD28⁺ por antígenos derivados del tumor en etapas más tempranas de la enfermedad, sea bajo o no asocie una caída en la expresión de CD28 tan inmediata o importante como para traducir un efecto distinguible y superior al observado en relación con la edad del individuo. Es posible que se requiera un mayor tiempo de contacto de las células tumorales con la población CD4⁺CD28⁺ para que, debido a un mayor número de divisiones celulares, se produzca una pérdida progresiva de células CD4⁺CD28⁺. Es decir, los cambios fenotípicos inducidos por el tumor en la población CD4⁺, requerirían múltiples estimulaciones, tal como ha sido sugerido por otros autores en trabajos muy recientes (*Goronzy y Weyand, 2001*).

Según nuestros resultados, aunque la monitorización de la población CD4⁺CD28⁺ pueda ser de interés para el seguimiento de los pacientes con melanoma, no parece que se trate de un parámetro que pueda predecir precozmente la evolución de la enfermedad. Para confirmar esta propuesta sería preciso realizar estudios adicionales, ya que hasta ahora no hemos encontrado en la literatura disponible informaciones que permitan contrastar este aspecto.

La ausencia de estímulos a través de la vía CD28 o la caída en su expresión, se ha asociado con la transmisión de señales incompletas que generan escasa o nula coactivación, lo cual conduce al fenómeno denominado parálisis o anergia de linfocitos T (*Harding y cols, 1992*). Dicha anergia, es uno de los mecanismos más importantes implicados en la inducción de tolerancia periférica y puede afectar, tanto *in vitro* como *in vivo*, a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (*Pérez y cols, 1997; Dubois y cols, 1998*).

Existen estudios que han demostrado que, en pacientes con melanoma, dentro de las células CD8⁺CD28⁻ existen algunas con función efectora específica frente al tumor, que además de ser CD28⁻ expresan receptores de inhibición. Es probable que dichas células estén implicadas en mecanismos de regulación periférica y eviten la aparición de una respuesta inmunitaria eficiente, sobre todo después de largos periodos de activación (*Speiser y cols, 1999; Becker y cols, 2000*). Otros autores han detectado células de este tipo con especificidad para antígenos de melanoma en sujetos sanos, sugiriendo para ellas un papel en el

control de la tolerancia periférica de las células T a algunos antígenos periféricos (Huard y Karlsson, 2000).

Las células $CD8^+CD28^+$, a diferencia de las $CD4^+CD28^+$, mostraron cambios de concentración poco ostensibles en relación con el espesor tumoral y la supervivencia del enfermo, tanto en sus valores basales como en los globales. Además, aunque los pacientes con más de 40 años de edad mostraron cifras significativamente más bajas de células $CD8^+CD28^+$ que los sujetos más jóvenes, estas diferencias también fueron más leves que las observadas en el caso de las células $CD4^+CD28^+$ en relación con la edad.

En nuestra serie, la caída en el número de células $CD8^+CD28^+$ era paralela a un aumento o expansión de la población $CD8^+CD28^-$. Esto parecía deberse más a una pérdida de expresión de CD28 que a un proceso de eliminación de las células $CD8^+CD28^+$. El estudio de las células $CD8^+CD28^-$ ayudaba a ofrecer desde la primera consulta una valoración prospectiva de la evolución de enfermedad. Esta información era más clara si se tomaba como indicador el cociente $CD8^+CD28^+ / CD8^+CD28^-$, el cual se modificaba de forma inversamente proporcional al espesor del tumor y al tiempo de supervivencia. Para este cociente se pudo establecer un **umbral o punto de corte**, de modo que cuando alcanzaba valores superiores a 1,5 se asociaba con un mejor pronóstico, con la ventaja de que la información que derivaba del análisis de esta población se hacía patente desde el momento en que el paciente acudía a la consulta por primera vez (ver figuras 5 a 7). En consecuencia, el estudio de las poblaciones $CD8^+28^+$ y $CD8^+28^-$ desde fases tempranas de la enfermedad podría plantearse como un parámetro útil para indicar el grado de resistencia o tolerancia al tumor y para la predicción precoz de un mejor o peor pronóstico del proceso. Así, mientras la abundancia de células $CD8^+CD28^+$ favorecería la respuesta frente al melanoma, la escasez de éstas, asociada a aumento de la población $CD8^+CD28^-$, facilitaría la extensión de la enfermedad de donde se derivaría una supervivencia más corta.

En general, los linfocitos $CD8^+CD28^-$ estuvieron siempre asociados con un peor pronóstico del tumor, hasta tal punto que el predominio de las células $CD8^+CD28^+$ sobre las $CD8^+CD28^-$ en los enfermos con melanomas de menor espesor y con mayor supervivencia, se convertía en una mayor concentración de células $CD8^+CD28^-$ que de $CD8^+CD28^+$ en los pacientes con melanomas de mayor espesor y en los que fallecieron (figuras 5 y 6).

Quizás el hecho más relevante sea que este subtipo de células ofrecía patrones de comportamiento que permitían establecer diferencias sobre el curso de la enfermedad, cuya visualización gráfica se ofrece en las ilustraciones de la figuras 8 y 9, que representan respectivamente los resultados del análisis por citometría de flujo de dos pacientes prototipo de melanoma con buen y mal pronóstico. Hasta ahora no se ha encontrado en la bibliografía ningún trabajo que contemple de modo prospectivo los cambios de concentración experimentados por las células $CD8^+CD28^+$ y $CD8^+CD28^-$ en sangre periférica de pacientes con melanoma, por lo que sería recomendable continuar este estudio en orden a una caracterización más precisa de estas células y de las funciones que realizan en estos pacientes. Además, su conocimiento podría aportar información de interés para el establecimiento de nuevas terapias antitumorales.

La expansión de la población $CD8^+CD28^-$ no podía justificarse sólo por un proceso de envejecimiento celular, ya que el aumento en las células $CD8^+CD28^-$ relativo a la mayor edad del sujeto, como mucho conseguía igualar los valores de las células $CD8^+CD28^+$. Además, los cambios en el cociente $CD8^+CD28^+ / CD8^+CD28^-$ fueron siempre menores en relación con la edad del sujeto que en relación con el espesor tumoral, la supervivencia o la aparición de metástasis. En este sentido, en pacientes con peor evolución, los linfocitos $CD8^+CD28^-$ podían llegar a representar el doble que los $CD8^+CD28^+$.

Conviene recordar que tanto en pacientes con melanoma como en individuos sanos se ha demostrado la expresión de receptores inhibidores de células NK (KIR), pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, en la superficie de una fracción pequeña pero consistente de células T $CD8^+$ específicas frente a antígenos de diferenciación melanocítica (*Huard y Karlsson, 2000*). Parece que la expresión de los KIR es más frecuente en los linfocitos $CD8^+$ que expresan $CD56$ (*Pittet y cols, 2000*), subtipo que en nuestra serie parece relacionarse con un peor pronóstico y cuya expansión se inicia desde estadios tempranos de la enfermedad. Estas células podrían ser $CD8^+CD56^+CD28^-$, aunque por las combinaciones de anticuerpos monoclonales usadas en el protocolo de análisis de esta memoria, no se ha podido demostrar que se corresponda con una población $CD28^-$, ni tampoco se ha estudiado la expresión de KIR en la misma. Es interesante también hacer notar aquí, que un segundo tipo de receptores de inhibición, pertenecientes a la familia de las lectinas, como

CD94, también se pueden expresar sobre linfocitos T de manera dependiente del estado de diferenciación durante la respuesta inmunitaria frente a tumores sólidos (Becker y cols, 2000). Así, estas células T se han encontrado tanto en el ganglio centinela, expresando altos niveles de CD28 y bajos de CD94, como en el melanoma primario, con expresión baja o nula de CD28 y elevada de CD94 (Becker y cols, 2000). Por tanto, parece que en las fases iniciales de activación (por ejemplo, en los estímulos primarios del ganglio linfático), las células T no expresan CD94, mientras que los mismos clones de células T sí expresan altos niveles de CD94 una vez que han alcanzado la fase efectora en el sitio donde está ubicado el tumor. Es posible que la modulación negativa de CD28 en las células T conlleve una modulación positiva de los KIR, quizás dirigida inicialmente a controlar la homeostasis (Speiser y cols, 1999).

Contrariamente a lo que sucedía con los estudios sobre la expresión de la molécula CD28, el análisis de la expresión de **CTLA-4** no ofreció resultados concluyentes. No obstante, en los pacientes con menor supervivencia y en los que desarrollaron metástasis viscerales parecía generarse una población residual CD8⁺CTLA-4⁺ (tablas XIII y XIV). De confirmarse este hecho, la expansión de células T que expresen la molécula CTLA-4 podría considerarse un factor de mal pronóstico. De todos modos sería necesario profundizar en estos estudios, mediante inducción de estímulos *in vitro* sobre células de estos pacientes, ya que la molécula CTLA-4 no es detectable en las células T en reposo, pero aparece tempranamente después de la activación, a partir de las 24 horas, alcanzando un máximo entre las 36-48 horas (Krummel y Allison, 1995; Chambers y Allison, 1997). Aunque estos últimos autores reconocen que la cinética y expresión de CTLA-4 en los distintos subtipos de células T no está bien definida (Chambers y Allison, 1999), parece que la sobreexpresión de CTLA-4 inhibe sobre todo la expansión de linfocitos T CD4⁺ (Yu y cols, 2000).

Por todo lo anterior, sería interesante determinar si la estimulación de las células T *in vivo*, lo cual conduce a una expansión clonal de células T implicadas en el desarrollo de tolerancia y/o anergia, se puede asociar con la inducción de la expresión de CTLA-4 sobre estas células. Para justificar la participación de células CTLA-4 en estos procesos, Chambers y cols. propusieron un modelo según el cual existiría un predominio de las señales inhibitorias mediadas por

CTLA-4 sobre las células T, cuando las APCs con baja expresión de moléculas B7 presentan los antígenos a dichas células T (*Chambers y cols, 1996*).

Las señales transmitidas por las moléculas coestimuladoras CD28 y CTLA-4, que se expresan en los linfocitos T, se producen después de la interacción con sus ligandos específicos, **CD80** y **CD86** (moléculas de la familia B7), que se expresan normalmente en las APCs maduras, aunque en determinadas situaciones pueden hacerlo sobre otras células, como los linfocitos T (*Azuma y cols, 1993; Hollsberg y cols, 1997; Jeannin y cols, 1999*).

Los **linfocitos B**, cuando poseen una buena expresión de moléculas CD80 y CD86, pueden funcionar como APCs e interactuar con sus ligandos específicos (CD28 y CTLA-4) sobre las células T; por el contrario, la pérdida de CD80 y CD86 limita su habilidad como APCs (*Croft y cols, 1997*). Esto puede convertir a los linfocitos B en células colaboradoras de buenas o malas respuestas. Por este motivo, el análisis de estas células constituyó una parte importante del segundo objetivo de esta tesis.

La expresión de CD86 es rápida y temprana, siendo suficiente para ello tan sólo la señalización a través del receptor de célula B (BcR) (*Natarajan y cols, 2001*), por lo que a la molécula CD86 se le han atribuido funciones en el inicio de la respuesta inmunitaria, desempeñando un papel crítico en la activación de células T y en el desarrollo de anergia (*Liu y cols, 1999*). En cambio, CD80 se expresa más tarde y necesita segundas señales de coestimulación del BcR, por lo que serviría para amplificar la respuesta inmunitaria (*Boussiotis y cols, 1996; Natarajan y cols, 2001*).

El estudio del número de linfocitos B que expresaban CD80 en los pacientes de esta serie, reflejó la existencia de una mayor concentración de células CD19⁺CD80⁺ en aquellos enfermos con mejor pronóstico y evolución (ver tablas XVIII y XIX, y figura 13). Es decir, se demostraron cifras más altas de dichas células en los enfermos con melanomas de menor espesor, en los que tenían mayor tiempo de supervivencia y en los que no desarrollaron metástasis, en comparación, respectivamente, con los pacientes que presentaban melanomas de mayor espesor, los que fallecieron y los que padecieron metástasis viscerales. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas y se pudieron observar desde el primer análisis, es decir, en las muestras basales. Las muestras procedentes de extracciones posteriores también revelaron cambios similares en

las cifras de células CD19⁺CD80⁺ entre los distintos grupos de estudio, aunque con menor nivel de significación.

En los sujetos mayores de 40 años, la concentración de células CD19⁺CD80⁺ era significativamente más baja que en el resto de enfermos. Todos los pacientes que fallecieron durante el estudio pertenecían a dicho grupo de mayor edad, el cual además englobaba a enfermos con melanomas de mayor espesor. Por tanto, se podría plantear la cuestión de si las diferencias observadas en las cifras de estas células en relación con el espesor tumoral, la supervivencia o la aparición de metástasis podrían atribuirse, al menos en parte, a la diferente edad media de los pacientes de cada grupo. Aunque la edad puede ejercer influencia sobre la concentración de las células CD19⁺CD80⁺ en sangre periférica, produciendo un descenso de la misma, podrían existir otras causas adicionales que justifiquen dicho descenso en los pacientes con melanoma de peor pronóstico o evolución. A favor de esta última hipótesis está el hecho de que cuando el análisis estadístico se limitaba a los pacientes con más de 40 años de edad, seguían demostrándose diferencias significativas intergrupo en cuanto a la concentración de células CD19⁺CD80⁺, con un nivel de significación cercano al obtenido con el total de pacientes.

Al contrario de lo observado con la población CD19⁺CD80⁺, ni los valores basales ni los globales de las células CD19⁺CD86⁺ se pudieron relacionar con el pronóstico o la evolución del tumor. No obstante, sí se apreció el posible efecto del envejecimiento del individuo sobre dichas células, cuyo número descendía significativamente con la mayor edad del sujeto.

En nuestro estudio, se detectó una población CD19⁺CD80⁺CD86⁺, que evolucionaba de modo similar a las células CD19⁺CD80⁺. No obstante, en contraste con lo observado en el caso de las células CD19⁺CD80⁺, al anular en lo posible el efecto de la edad, limitando el estudio a aquellos sujetos mayores de 40 años, aunque se seguía observando un número más elevado de células CD19⁺CD80⁺CD86⁺ en los pacientes con mejor pronóstico, las diferencias intergrupo en la concentración de estas células ya no resultaron significativas.

Hasta ahora, numerosos estudios se han dirigido a evaluar la modulación de la molécula CD80 directamente sobre la célula tumoral para evitar el escape a la inmunovigilancia (*Sule-Suso y cols, 1995; Miyazono y cols, 1999; Mackensen y cols, 1999*). Sin embargo, la expresión de CD80 y CD86 en células B humanas ha

sido menos estudiada. En general, dicha expresión se observa en linfocitos B activados (*Jeannin y cols, 1997*). En cuanto a la expresión de estas moléculas en linfocitos B circulantes en situaciones de estimulación antigénica crónica, se ha visto que las células B CD80⁺ se encuentran elevadas en la esclerosis múltiple activa, y las células B CD86⁺ en el lupus eritematoso sistémico, siendo ambas elevaciones críticas en el desarrollo de la enfermedad a la que se asocian (*Genc y cols, 1997; Bijl y cols, 2001*). Nuestros datos apoyan la idea de que la expresión de CD80 puede ser muy importante en las células B que pueden mediar una presentación de antígenos tumorales, pero en este caso en sentido positivo, puesto que la pérdida de esta población parece asociarse con una peor evolución de los pacientes.

En nuestra serie, el interés de las células CD19⁺CD80⁺ no se limitaba a la información precoz que se obtenía sobre el estado inmunitario del paciente, sino que fue útil también en el proceso de seguimiento ya que sus valores globales se asociaron de modo positivo con todos los factores de buen pronóstico (figura 13). Esto, junto con la sencillez de esta prueba, pueden convertir a la población CD19⁺CD80⁺ en candidata para ser monitorizada con fines pronósticos. Además, su aparente beneficio en la resistencia frente al avance tumoral, sugiere la necesidad de investigar los mecanismos que regulan la expresión de estas moléculas coestimuladoras sobre los linfocitos B de pacientes con melanoma, ya que los hallazgos que de ello deriven pueden dar origen al desarrollo de nuevas modalidades de inmunoterapia antitumoral.

En situaciones de estímulos antigénicos repetidos se puede generar una población de linfocitos T CD8⁺CD28⁻ con propiedades supresoras de la respuesta alogénica (*Colovai y cols, 2001*). Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que este tipo celular es capaz de limitar la expresión de CD86 en linfocitos B que actúan como APCs, con la consiguiente atenuación de la respuesta proliferativa de linfocitos T CD4⁺ (*Li y cols, 1999*). Nuestros datos, en cambio, revelaron que, a medida que aparecían más células CD8⁺CD28⁻, se producían cambios pequeños en el número de células B CD86⁺, mientras que las CD80⁺ disminuían más. En este sentido, en aquellos pacientes con mayor número de células CD8⁺CD28⁻ también se daban las cifras más bajas de células CD19⁺CD80⁺. Teniendo en cuenta que la expresión de CD80 es más tardía que la de CD86 y representa un mayor nivel de estimulación de la célula que la expresa, parece razonable pensar

que la expresión de CD80 también podría estar afectada por los clones de células T supresoras CD8⁺CD28⁻ y, por tanto, daría lugar a un menor nivel de coestimulación por parte de las células B. Esta podría ser la situación observada en nuestros pacientes más afectados por el melanoma.

En diversos trabajos se ha demostrado que la expresión de CD80 y CD86 se puede inducir en linfocitos T, además de en células B (Azuma y cols, 1993; Holsberg y cols, 1997; Jeannin y cols, 1999). Hasta ahora disponemos de pocos datos que contribuyan a explicar cuál sería la función que deriva de la presencia de estas moléculas sobre los linfocitos T. En humanos, se ha demostrado que los linfocitos T activados CD86⁺ pueden desempeñar un papel accesorio en la coestimulación de células T vírgenes (Jeannin y cols, 1999). Recientemente, también se ha descrito una forma soluble de CD86 que parece tener gran capacidad para inducir activación celular (Jeannin y cols, 2000). Por esto se puede especular que la sobreexpresión de CD86, cualquiera que sea la estirpe celular sobre la que se produzca, puede conducir a una mayor liberación de la forma soluble y a una mayor activación.

Según nuestros datos, pueden existir poblaciones residuales de células no B, con fenotipo CD19⁻CD5⁺CD80⁺ (probablemente linfocitos T), cuya presencia podría estar relacionada con una mejor evolución y respuesta frente al tumor (ver figura 12), de modo similar a lo que ocurría con la presencia de un mayor número de linfocitos B CD80⁺ (ver figura 13). No obstante, al ser una población de escasa representación, convendría tomar con cautela estos datos y realizar estudios más precisos dirigidos a su correcta identificación y valoración pronóstica. Algo más relevante, en cuanto al número de células que pudieron detectarse, fue la observación de que la expansión de las células de fenotipo CD19⁻CD5⁺CD86⁺, al contrario que las células CD19⁻CD5⁺CD80⁺, se asociaba con situaciones de peor pronóstico (figura 13).

De acuerdo con lo anterior, y aunque es preciso confirmar estos resultados, es posible que las células CD19⁻CD5⁺CD80⁺ y CD19⁻CD5⁺CD86⁺ puedan tener funciones diferentes. Así, mientras que la expansión de las células CD19⁻CD5⁺CD80⁺, como la de las CD19⁺CD80⁺, contribuiría a mejorar las respuestas y, en definitiva, el curso de la enfermedad, el crecimiento de las CD19⁻CD5⁺CD86⁺ podría contribuir a una atenuación de la respuesta frente al tumor y, por tanto, asociarse con un peor pronóstico. En este sentido, se ha visto que la expresión de

CD86 en células T murinas transfectadas provoca la unión preferente de dicha molécula a CTLA-4, pero no a CD28, lo cual sugiere que la molécula CD86 expresada en células T, más que coestimular, inhibiría las respuestas T (*Greenfield y cols, 1997*). Adicionalmente, también en modelos murinos, se ha demostrado que la sobreexpresión de CD86 en los linfocitos T CD4⁺ paraliza su proliferación y limita su capacidad para colaborar con los linfocitos T CD8⁺ (*Yu y cols, 2000*). Además, la expresión de CD86 puede favorecer la expansión de poblaciones T CD8⁺ que pierden la molécula CD28 (*Yu y cols, 2000*). Por ambas vías, la expresión de CD86 sobre los linfocitos T acabaría limitando las respuestas efectivas.

Por tanto, se plantea una interesante cuestión sobre el papel de estas dos moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86, tanto expresadas en APCs profesionales como en APCs facultativas. En este sentido, se ha visto que pueden dirigir señales coestimuladoras distintas. Algunos autores han demostrado que CD86, pero no CD80, es capaz de proveer la primera señal a células T vírgenes para dirigir las hacia la producción de IL-4, dirigiendo así la respuesta inmunitaria más hacia el tipo Th2, mientras que CD80 dirige una señal diferenciadora más neutral, induciendo niveles altos de IL-2 y bajos de IL-4 (*Freeman y cols, 1995*). En la encefalomiелitis alérgica experimental, donde se producen gran cantidad de células CD80⁺, la administración de anticuerpos anti-CD80 en el momento de la inmunización resulta en la generación de clones de células Th2 (*Kuchroo y cols, 1995*). De acuerdo con los trabajos anteriores, nuestros datos apoyan la hipótesis de un diferente papel de los linfocitos T o B CD80⁺CD86⁻ frente a los CD80⁻CD86⁺.

5. ESTUDIO DE MOLÉCULAS PERTENECIENTES A LA SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DE TNF.

Dentro de este grupo de moléculas se analizaron las dos vías mejor conocidas, la vía del CD95/CD95L y la de CD40/CD40L.

5.1. Vía CD95/CD95L

Se podría pensar que los descensos en los linfocitos B, descritos en el apartado anterior, fueran debidos, al menos en parte, a un incremento en los fenómenos de apoptosis. No obstante, si dicho aumento en la apoptosis tiene lugar, no parece que implique a la vía CD95-CD95L ya que, en nuestro estudio, se observaron pocas diferencias intergrupo en el número de linfocitos B que expresaban la molécula CD95.

Se ha descrito que tanto la intensidad de expresión de CD95 sobre los linfocitos, como el número de células CD95⁺, aumenta durante el proceso de envejecimiento del individuo, lo cual puede influir en los estados de tolerancia inmunológica que se establecen por efecto de la senescencia (*Potestio y cols, 1999*). Sin embargo, los resultados obtenidos de nuestros pacientes mostraron que la concentración más alta de células CD95⁺, tanto T como B, se daba en los sujetos menores de 40 años, en comparación con los de mayor edad, alcanzando significación estadística en el caso de las células CD19⁺. Además, el número de células CD19⁺CD95⁺ era significativamente más bajo en los enfermos con menor supervivencia (tablas XV y XVIII). No obstante, la significación de estas diferencias en relación con la supervivencia fue menor que la de los cambios observados según la edad del paciente. Por tanto, es posible que las diferencias en el número de células CD19⁺CD95⁺ en relación con la mayor o menor supervivencia de los enfermos, sean debidas, al menos en parte, a la diferente edad de los pacientes, más que a un posible relación con el tumor. A pesar de todo, el posible efecto de la edad sobre el número de células CD19⁺CD95⁺ no excluye que, en pacientes con melanoma, la sobreexpresión de la molécula CD95L en las células del tumor pueda provocar la muerte por apoptosis de los linfocitos que expresen CD95. En apoyo de esta hipótesis, existen trabajos que muestran que la expresión de CD95L (FasL) en la superficie del melanoma pueden inducir apoptosis sobre los CTLs (*Maeda y cols, 1998; Ferrarini y cols, 1999*). Además, la disminución en la expresión de CD95 y el aumento en la expresión de FasL en las células de melanoma se ha relacionado con una mayor progresión de la enfermedad (*Soubrane y cols, 2000*).

En cuanto a la expresión de CD95L sobre las células linfoides, según nuestros resultados, no parece que esta molécula sea detectable sobre linfocitos de sangre periférica de pacientes con melanoma. Esto se puede deber a que dicha molécula actúe de forma inmediata a su inducción, lo cual impide su

detección en membrana, o bien a que pase a la forma soluble (sCD95L), la cual puede también interaccionar con CD95 e incrementar la apoptosis (*Mouawad y cols, 2000*).

En pacientes con melanoma, se ha descrito una aceleración en la muerte de los linfocitos T activados y susceptibles de sufrir apoptosis (*Saito y cols, 2000*). Además, se ha comunicado que aunque la apoptosis ocurre en todas las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con melanoma, las más susceptibles son los linfocitos CD3⁺CD95⁺ y, en especial, los que expresan CD8 (*Saito y cols, 2000*). Nuestros datos parecen apoyar que la apoptosis de las células CD3⁺CD95⁺ puede estar asociada con un peor pronóstico pues, en las muestras basales, el número de linfocitos CD3⁺CD95⁺ estaba mucho más reducido en los pacientes que fallecieron que en el resto, aunque dichas diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística. Sin embargo, la concentración de estas células aumentaba de forma significativa a partir del segundo año de seguimiento, hasta alcanzar cifras equivalentes o superiores a las de los pacientes con mayor supervivencia (tabla XIII). Aunque se desconoce la posible causa de este comportamiento, se trata de una observación que sería preciso confirmar en series más amplias y usando métodos adicionales, como la detección de sCD95 o sCD95L en suero (*Mouawad y cols, 2000*) o en el sobrenadante de cultivos celulares. Una explicación para este hallazgo podría ser que los melanomas con peor pronóstico vital sean aquellos que presentan mayor expresión de la molécula CD95L, la cual, como ya se ha señalado, puede inducir apoptosis sobre los CTLs (*Maeda y cols, 1998; Ferrarini y cols, 1999*). Esto daría lugar a un descenso inicial en las cifras de células CD3⁺ sensibles a la apoptosis por dicha vía Fas-FasL. En este sentido, se puede plantear la hipótesis de que la presencia en un paciente de cifras basales más bajas de células CD3⁺CD95⁺, podría estar reflejando la existencia de micrometástasis subyacentes de melanoma, aunque todavía no haya sido posible detectarlas. De hecho, ya se ha demostrado que las células de melanoma metastásico presentan mayor expresión de CD95L (*Soubrane y cols, 2000*). Lo que no parece tan fácil de explicar es el mecanismo por el que se incrementa el número de células CD3⁺CD95⁺ en los pacientes con pronóstico infausto hasta igualarse con el del resto de enfermos. Sin embargo, no se debe olvidar que pueden existir clones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ específicos contra antígenos de melanoma que son resistentes a la

apoptosis vía Fas-FasL (*Rivoltini y cols, 1998*), por lo que, con el tiempo, se podría producir una selección y proliferación de dichos linfocitos en aquellos pacientes con células T inicialmente más sensibles a la apoptosis por la vía CD95-CD95L. En cualquier caso, conviene tener presente que otras rutas independientes de la vía CD95-CD95L podrían inducir apoptosis de los linfocitos específicamente activados.

5.2. Vía CD40/CD40L

Aunque los estudios iniciales sobre la vía CD40-CD40L se focalizaron sobre su papel en la inmunidad humoral, varias observaciones han sugerido que dicha vía desempeña una función más amplia en el sistema inmunitario. La importancia del sistema CD40-CD40L en la regulación de la respuesta inmunitaria, incluyendo la respuesta antitumoral, queda patente en pacientes con defectos en dicho sistema, como ocurre en el síndrome hiper IgM ligado a X, el cual se asocia tanto a una mayor incidencia de infecciones como de cáncer de estómago y linfomas (*Laman y cols, 1994*).

El estímulo a través de CD40 ayuda a desencadenar una respuesta antitumoral eficiente, pues aumenta la expresión de HLA en las células tumorales, lo cual favorece su reconocimiento por los CTLs, y mejora la fase efectora de la respuesta inmunitaria, a través del aumento en la síntesis de citoquinas y de la expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras (*Grewal y Flavell, 1998; Costello y cols, 1999*). Por tanto, la presencia de CD40 en la superficie de las células tumorales puede favorecer la generación de una respuesta específica frente al tumor por parte de las células T (*Alexandroff y cols, 2000*).

Junto al beneficio que puede suponer la expresión de CD40 sobre las células tumorales, el correcto funcionamiento del sistema inmunitario también parece necesitar la expresión de dicha molécula en células como los linfocitos B y los monocitos. Así, los monocitos CD40⁺ pueden ser activados por los linfocitos T CD40L⁺ para ejercer su función citostática y citotóxica (*Stout y Suttles, 1996*).

En esta tesis, el intento de investigar los cambios celulares en la vía CD40/CD40L quedó limitado a la evaluación de las variaciones en el número de

células que expresaban CD40, ya que no se llegaron a detectar células CD40L⁺ en sangre periférica.

A través de la vía CD40-CD40L, los macrófagos aumentan su capacidad de síntesis de citoquinas (*Wagner y cols, 1994*). De hecho, en ratones con deficiencias en dicha vía, las células T activadas tienen menos capacidad de inducir la síntesis de TNF α en los macrófagos (*Stout y cols, 1996*). Las señales transmitidas por CD40 también pueden aumentar la respuesta inflamatoria, a través de la disminución de la apoptosis de los monocitos, de modo análogo a lo que sucede con las células B (*Tsubata y cols, 1993*). Es decir, el estímulo de la vía CD40-CD40L es capaz de impedir que los monocitos entren en apoptosis. Esta inhibición de la apoptosis puede deberse a un efecto autocrino, a través de TNF α , o a la inducción directa de genes o la activación de proteínas con capacidad antiapoptótica por parte de CD40 (*Stout y Suttles, 1996*).

Las interacciones CD40-CD40L favorecen los estadios iniciales de la respuesta inmunitaria a través del estímulo de la capacidad de presentación antigénica por parte de las APCs. Además, el ligamiento de CD40 durante la interacción de la célula T con el macrófago que actúa como APC resulta en la producción de IL-12 (*Shu y cols, 1995*), la cual favorece la maduración de células Th1 y el desarrollo de la inmunidad celular (*Dugas y cols, 1995*).

En esta memoria, el estudio de la coexpresión de CD40 en células CD14⁺ (monocitos) y linfocitos CD14⁻ (probablemente linfocitos B) reveló que, en los pacientes que desarrollaron metástasis, se produjo un descenso progresivo y significativo en el número de estas células, especialmente de **células CD14⁺CD40⁺** (tabla XIX; figura 19). La edad de los sujetos no parecía ejercer ningún sesgo en las diferencias intergrupo de los monocitos CD40⁺ pues, cuantitativamente, estas células estaban igualmente representadas en los dos grupos de edad analizados.

Con respecto al papel funcional de los monocitos y los linfocitos B, es conocida su importancia en el procesamiento y presentación de antígenos en cualquier tipo de respuesta inmunitaria y, a través de esta función, deben ser relevantes en la defensa frente al melanoma. Teniendo en cuenta lo anterior, el descenso en el número de monocitos CD40⁺ y linfocitos CD14⁻CD40⁺ observado en los estadios más avanzados de la enfermedad, podría traducirse en un fallo de

los procesos de reconocimiento y presentación antigénica, debido a un escaso poder de activación de la vía CD40-CD40L.

El reclutamiento de células con capacidad de procesar y presentar el antígeno tumoral, entre ellas los monocitos y los linfocitos B, es importante para evitar el escape de la inmunovigilancia por parte del tumor (Geertsen y cols, 1999) y, por tanto, para prevenir la aparición de metástasis. Dicho reclutamiento parece más fácil si el número de estas células en sangre periférica es mayor, mientras que su escasez o ausencia permitiría la diseminación del tumor y una disfunción en la respuesta específica frente al melanoma. En este sentido, es posible que los monocitos circulantes que expresan CD40 desempeñen un papel relevante en la prevención de la diseminación del melanoma.

Los **linfocitos CD14⁻CD40⁺**, probablemente linfocitos B CD40⁺, también podrían jugar un papel importante en la defensa frente al melanoma pues, además de sufrir cambios cuantitativos, también experimentaron cambios en su fenotipo en función del nivel de expresión de moléculas HLA de clase I. Así, cuando se investigó la densidad de HLA-I en la membrana de las células CD14⁻CD40⁺, se observó que la supervivencia era significativamente superior en los individuos que tenían mayor número de células CD14⁻CD40⁺HLA^{alto}. En contraste con lo anterior, en los enfermos con evolución fatal, la concentración basal de células CD14⁻CD40⁺HLA^{bajo} era superior al doble que la de las células CD14⁻CD40⁺HLA^{alto}. Por ello, el cociente resultante de dividir las células CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} entre las células CD14⁻CD40⁺HLA-I^{bajo} era más alto en los enfermos que sobrevivieron que en los que fallecieron, lo cual fue significativo al analizar las muestras basales, donde dicho cociente fue superior a 0,5 en el 80% de los supervivientes e inferior a dicho valor en el 100% de los sujetos que fallecieron. En conclusión, la detección precoz de un mayor número de células CD14⁻CD40⁺ con expresión alta de HLA de clase I, o mejor aún, un cociente CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} / CD14⁻CD40⁺HLA-I^{bajo} mayor de 0,5 puede constituir un factor predictivo de buen pronóstico en sujetos con melanoma. La mayor edad de los sujetos con peor evolución no parecía ser responsable de todas estas diferencias basales observadas en la población de células CD14⁻CD40⁺, pues no se demostraron cambios significativos de dicha población celular en relación con la edad al analizar las muestras basales (tablas XV y XVIII).

La población $CD14^-CD40^+HLA-I^{\text{alto}}$ mostró siempre valores medios superiores en los enfermos que no desarrollaron metástasis que en los que sí sufrieron metástasis (figura 21a), hecho que no se observó con la población $CD14^-CD40^+HLA-I^{\text{bajo}}$ (figura 21b). Esto parece apoyar de nuevo que a mayor intensidad de expresión de HLA de clase I es este tipo de células, mejor puede ser la respuesta antitumoral y menor la aparición de metástasis, lo cual, en definitiva, se traduce en un mayor tiempo de supervivencia.

6. DIFERENCIAS EN LAS CÉLULAS $CD3^+CD16/56^+$ Y $CD3^-CD16/56^+$.

Con respecto a las células $CD16/56^+$, en primer lugar se discutirán aquellas que se incluyen dentro de los linfocitos T $CD3^+$ y, en segundo lugar, las células NK ($CD3^-$). En ambos tipos de células se ha analizado la expresión o no de la molécula CD8.

6.1. Linfocitos $CD3^+CD16/56^+$

Las cifras absolutas de la población $CD3^+CD16/56^+CD8^-$, que podría corresponder a linfocitos T $CD4^+$ con funciones NK (células NKT), no sufrían modificaciones significativas en relación con la edad del paciente. En cambio, el número de estas células sí era significativamente más alto en los individuos que fallecieron que en los que sobrevivieron (ver figura 11a), y también estaba significativamente más elevado en el grupo MV que en el resto de pacientes (ver figura 11b).

Dado que existen linfocitos $CD3^+CD16/56^+$ capaces de reconocer antígenos de manera no restringida por el MHC y que expresan receptores de inhibición de células NK (KIRs) (*Falk y cols, 1995*), nos podríamos plantear si las células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ observadas en nuestros pacientes podrían expresar KIRs y si éstos podrían influir de algún modo en su función. Recientemente, se ha publicado que los linfocitos T $CD4^+$, después de repetidas estimulaciones a través del TcR en presencia de moléculas coestimuladoras CD28/CTLA-4 y CD80/CD86, pueden cambiar su fenotipo, adquirir KIRs y secretar perforinas, convirtiéndose en células efectoras citotóxicas (*Wang, 2001*). No parece probable que esta sea la

función primordial de la población $CD3^+CD16/56^+CD8^-$ que predomina en los pacientes con melanoma de peor pronóstico, ya que su asociación con una menor supervivencia y, quizás una peor respuesta frente al tumor, sugiere más bien una función supresora/tolerogénica que una función reactiva frente al tumor. Aunque, con los datos disponibles, no es posible interpretar cuál sería la verdadera función de las células $CD3^+CD16/56^+CD8^-$, el aumento de su número en los pacientes con peor evolución, patente desde el comienzo del seguimiento del enfermo (ver figura 11), hace que su simple determinación pueda resultar de interés para poder predecir precozmente el posible curso de la enfermedad.

En modelos murinos, se ha sugerido la existencia de células T $CD4^+$ supresoras de la acción de linfocitos T $CD8^+$ citolíticos específicos frente a células de melanoma. La eliminación de dichos linfocitos $CD4^+$, con fenotipo Th2, permitiría un predominio de la respuesta Th1 y la generación de linfocitos $CD8^+$ fuertemente activados frente a las células tumorales (*Nagai y cols, 2000*). Sería interesante profundizar en el conocimiento sobre esta población y sus funciones, pues de este modo, quizás se podrían comprender mejor algunos de los mecanismos facilitadores de la progresión del melanoma e incluso establecer terapias dirigidas a corregir su efecto.

En contraste a lo observado con la población anterior, la cuantificación de células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$, según nuestros datos, no resulta tan informativa pues sus modificaciones no son suficientes para diferenciar situaciones de mal pronóstico (ver figura 10).

Se ha propuesto que la función citolítica de las células T $CD8^+$ tiene una relación directa con la expresión de CD56 en los individuos sanos (*Pittet y cols, 2000*). Por tanto, es posible que las células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$, por su carácter probablemente citolítico, tengan mayor prevalencia en pacientes con mejor respuesta inmunológica y, por ende, mejor pronóstico. De modo inverso, es posible que dichas células se vean de algún modo contrarrestadas progresivamente en el curso de la enfermedad, especialmente en pacientes con peor evolución. Sin embargo, la determinación de su concentración no fue útil para diferenciar a los pacientes con distinta supervivencia.

Las células $CD3^+CD16/56^+CD8^+$ podrían corresponder, al menos en parte, a los linfocitos T con fenotipo $CD8^+CD28^-$ (*Speiser y cols, 1999*). Sin embargo, debido al protocolo de marcaje que se ha empleado con las muestras analizadas

en este trabajo, no se ha podido confirmar esta hipótesis, por lo que se trata de un punto a dilucidar en futuros experimentos.

6.2. Células CD3⁻CD16/56⁺

En la población NK se distinguieron al menos dos subtipos de células, en función de la expresión o no de la molécula CD8.

A diferencia de lo ocurrido con otras poblaciones celulares, donde podía existir la duda de si la disminución en su concentración podía ser secundaria a la edad más avanzada, las células NK, especialmente las CD8⁺, eran más numerosas en los individuos de mayor edad. Esto sirve para resaltar todavía más los cambios observados en el número de células NK CD8⁺ en relación con la supervivencia de los pacientes. Aunque todos los enfermos fallecidos eran mayores de 40 años, el número de células NK CD8⁺ era significativamente más bajo en los pacientes que fallecieron en comparación con los que presentaron una mayor supervivencia (ver figura 14). Así, todos y cada uno de los pacientes que fallecieron presentaron, en todas las muestras de sangre, un cociente CD3⁻CD16/56⁺CD8⁺ / CD3⁻CD16/56⁺CD8⁻ inferior a 0,75. Como dato adicional, en nuestra serie se ha podido constatar que cuando el número absoluto de células CD3⁻CD16/56⁺CD8⁺ era inferior a 70 células/ μ L, esto se asociaba con una evolución fatal de la enfermedad (ver figuras 14b y 15a). Hasta ahora, en ninguna fuente consultada se ha señalado un hallazgo similar, por lo que consideramos importante extender este estudio a series más amplias, ya que de confirmarse, se podría proponer la monitorización sistemática de estas células en pacientes con melanoma. Un estudio inmunofenotípico más exhaustivo y el análisis de la diferente función de los diferentes subtipos de células NK circulantes, podría ayudar a un mejor conocimiento del papel que estas células ejercen en la lucha frente al melanoma.

Las cifras significativamente más elevadas de células CD3⁻CD16/56⁺CD8⁻ en el grupo MR, en comparación con los grupos NM y MV, podría indicar que el microambiente en las metástasis regionales de melanoma puede favorecer de algún modo la expansión de esta población.

Aunque se ha propuesto que puedan existir subtipos de células NK diferentes fenotípicamente (López-Botet y Bellón, 1999; Cooper y cols, 2001)

hasta ahora no ha sido fácil su separación e identificación, dada su escasa representación en sangre periférica, su difícil mantenimiento *in vitro* y la presencia de numerosos receptores inespecíficos que pueden afectar a su actividad citolítica (Lanier, 1997). En principio, y a la vista de las asociaciones detectadas en nuestro estudio, cabe pensar que las células NK CD8⁺ sean funcionalmente más eficientes que las CD8⁻, o que éstas últimas se asocien con un estado de tolerancia, quizás inducido por el tumor, de modo que expresen un mayor número KIRs, que inhibirían su actividad antitumoral. En ambos sentidos parece imprescindible un nuevo abordaje dirigido a determinar no sólo la expresión de los distintos tipos de KIRs, sino también los receptores de activación de células NK (KARs), de cuyas combinaciones así como de la conjunción con la expresión o no de CD8, dependería finalmente su acción efectora (Wang, 2001). Aunque no hemos encontrado referencias en la literatura al respecto, resulta muy tentador especular sobre la posible función contrapuesta de ambas poblaciones de células NK, CD8⁺ y CD8⁻, quizás por un papel preferente de CD8 que refuerce la función citolítica de modo que pueda anular el efecto inhibitorio de los KIRs. Lo más probable es que se produzca un espectro de actividades diferentes, en función de las distintas combinaciones entre la mayor o menor expresión de CD8 y de los KIRs.

7. CUANTIFICACIÓN Y POLIMORFISMO DE CITOQUINAS

La coexistencia, dentro de un mismo melanoma, de unas zonas donde existen fenómenos de regresión y otras donde se produce progresión del tumor, parece indicar que el microambiente tumoral puede influir de modo importante sobre el resultado de la respuesta inmunitaria antitumoral (Colombo y cols, 1992).

Se ha demostrado que la producción local de citoquinas juega un papel primordial en el resultado final de la lucha antitumoral por parte del sistema inmunitario (Wagner y cols, 1998). El estímulo apropiado a través de moléculas solubles o citoquinas puede ayudar a despertar una respuesta antitumoral que, de otro modo, sería indetectable. Por el contrario, un estímulo inadecuado por parte de dichas citoquinas puede no activar o incluso suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral (Colombo y cols, 1992). Por ello, la transducción de células tumorales

con genes de determinadas citoquinas, puede conducir al rechazo de dichas células modificadas genéticamente y favorecer la inmunidad sistémica contra células del mismo tumor en caso de un contacto posterior (*Pardoll, 1995*). Estos resultados se corroboran clínicamente con la existencia de pacientes que muestran regresión de un melanoma después de administrarles inmunoterapia adyuvante (*Rosenberg y cols, 1994*).

En la literatura, el estudio de la posible interacción entre diversos tipos de citoquinas y las células de melanoma se ha llevado por distintos medios. Por una parte, se han publicado diversos trabajos centrados en el estudio de la expresión local del ARNm de diferentes citoquinas, en lesiones de melanoma tanto primarias como metastásicas (*Wagner y cols, 1998; Lowes y cols, 1997*). Otros autores, han determinado los niveles de citoquinas, como IL-10 o $\text{INF}\gamma$, en los sobrenadantes de cultivos de células de melanoma (*Yue y cols, 1997; Dummer y cols, 1998*). Además, existen múltiples evidencias de que los niveles séricos de determinadas citoquinas, fundamentalmente las de fenotipo Th2, como IL-6 o IL-10, pueden correlacionarse con la carga tumoral del melanoma y/o con el estadio más o menos avanzado de dicha enfermedad, es decir, con la aparición de metástasis (*Lu y cols, 1992; Dummer y cols, 1995; Fortis y cols, 1996; Mouawad y cols, 1996; Deichmann y cols, 2000; Boyano y cols, 2000*). Por este motivo, en esta tesis se ha realizado, como parte del tercer objetivo de la misma, el estudio de los niveles séricos de una serie de citoquinas representativas de cada uno de los fenotipos Th1 (IL-15 e $\text{INF}\gamma$) y Th2 (IL-6 e IL-10).

En lesiones de melanoma, la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio peritumoral se asocia con niveles más altos de ARNm de **citoquinas de tipo Th1**, entre ellas el $\text{INF}\gamma$ (*Wagner y cols, 1998*). Además, dentro de este tipo de lesiones, la mayor expresión de citoquinas como IL-15 e IL-2, pero no de $\text{INF}\gamma$, se ha asociado con la presencia de fenómenos de regresión. Por el contrario, en lesiones de melanoma donde no existen fenómenos de regresión, la expresión de IL-15 e IL-2 es mucho más baja (*Wagner y cols, 1998*). Estas observaciones pueden explicarse teniendo en cuenta que la inhibición de la IL-15 da lugar a una disminución de la expresión de HLA de clase I en las células de melanoma (*Azzarone y cols, 1996; Barzegar y cols, 1998*), lo cual dificulta el reconocimiento de las células malignas por los linfocitos T. Sin embargo, la IL-15 puede activar la actividad citotóxica de los linfocitos frente a células de melanoma, por un

mecanismo no restringido por el MHC, a través de perforinas (*Gamero y cols, 1995*). Otros autores también han demostrado una correlación entre la mayor presencia de citoquinas de tipo Th1 y la mayor respuesta inmunitaria frente al melanoma, y han propuesto que la infiltración del tumor por células T CD4⁺ activadas productoras de este tipo de citoquinas favorece la regresión del melanoma (*Lowes y cols, 1997*).

A pesar de todo lo anterior, en la serie de pacientes estudiada en esta tesis, no se ha podido demostrar ninguna relación entre los niveles séricos de INF γ e IL-15 y la progresión del melanoma (tablas XX y XXI). Bien es cierto que, en nuestro caso, se pretendían evaluar cambios sistémicos en los niveles de citoquinas, siempre más difíciles de demostrar que los cambios locales. Pero también es posible que no exista correspondencia entre la presencia de ARNm en las lesiones y su traducción en proteínas.

Se ha señalado una falta de correlación significativa entre la cantidad de ARNm de INF γ en las lesiones de melanoma y la regresión de las mismas (*Lowes y cols, 1997*). En nuestra serie, se han apreciado niveles medios más bajos de INF γ sérico en los pacientes que fallecieron que en los que permanecían vivos tras el periodo de seguimiento; no obstante, dichas diferencias no llegaron a ser significativas (tabla XX). Una hipótesis para explicar estas diferencias es que, teniendo en cuenta que las células T CD8⁺ citotóxicas secretan IFN γ como mediador de algunas de sus funciones efectoras (*Dobrzanski y cols, 2001*), es posible que, en los pacientes que fallecieron, el aumento observado en el número de linfocitos T CD8⁺CD28⁻, que podrían perder actividad citotóxica, se asocie con un descenso en la secreción de INF γ .

En cualquier caso, existen datos contradictorios con respecto al efecto del INF γ sobre las células de melanoma humano. Por una parte, el INF γ puede incrementar la actividad citolítica por parte de células efectoras de la inmunidad tanto natural como específica (*Maggi y cols, 1993*), e inhibir directamente el crecimiento de las células de melanoma (*Garbe y Krasagakis, 1993*). Por otra parte, parece que el tratamiento de células de melanoma con INF γ , puede dar lugar a un fenotipo biológicamente más agresivo y menos diferenciado de dichas células (*Garbe y Krasagakis, 1993*), lo cual puede contribuir a la diseminación tumoral.

En cuanto a la variación en el tiempo de la concentración sérica de **IL-6** observada en los enfermos de nuestra serie, resultó bastante llamativa la evolución diferente en los pacientes con peor pronóstico. En concreto, aquellos sujetos que fallecieron antes de los 30 meses del diagnóstico del melanoma, mostraron un incremento significativo de los niveles séricos de IL-6 una vez transcurridos 18 meses desde la primera visita (en la última extracción de sangre) (tabla XX y figura 22). Según estos resultados, se podría deducir que la IL-6 puede jugar un papel en la distinta evolución clínica de los pacientes con melanoma.

Existen datos contrapuestos sobre el papel favorecedor o inhibidor de la progresión del melanoma por parte de la IL-6. Se ha descrito que la IL-6 se comporta como una citoquina inhibidora del crecimiento de las células de melanoma en estadios tempranos de la enfermedad, cuando el melanoma está en la fase de crecimiento radial, sin gran capacidad metastásica (*Lu y cols, 1992*). Esta acción inhibidora temprana del crecimiento tumoral se puede deber a que la IL-6 estimule la diferenciación de las células citotóxicas (*Kishimoto y Akira, 1992*) e induzca la expresión tanto de IL-2R (*Kishimoto, 1989*) como la producción de IL-2 por las células T activadas (*Kishimoto, 1989*). A pesar de ello, las células procedentes de melanomas tanto en fase de crecimiento vertical como metastásicos, son completamente resistentes al efecto antiproliferativo de la IL-6 (*Lu y cols, 1992*). Este distinto comportamiento parece característico de las células de melanoma, neoplasia que se ha considerado como paradigma de la capacidad de desarrollar resistencia, parcial o completa, a la acción de múltiples citoquinas durante la progresión tumoral (*Kerbel, 1992*). Por tanto, es posible que la progresión de un melanoma pueda ser parcialmente debida al desarrollo de una resistencia o pérdida de sensibilidad frente a los mecanismos de control negativo del crecimiento de las células tumorales (por ejemplo, la IL-6), lo cual facilita la aparición de metástasis. Además, en estadios avanzados de la enfermedad, la IL-6 puede incluso comportarse como un factor estimulante del crecimiento de las células de melanoma (*Kerbel, 1992*), fenómeno ya descrito en células de mieloma múltiple (*Levy y cols, 1991*). De hecho, las células humanas de melanoma, en estadios avanzados de la enfermedad, pueden producir IL-6 (*Lu y Kerbel, 1992*). Adicionalmente, la IL-6 en altas concentraciones inhibe la proliferación de las

células T (*Zhou y cols, 1991*) y, al contrario que la IL-10, favorece la angiogénesis tumoral (*Motro y cols, 1990*).

Algunos autores han demostrado una correlación positiva entre los niveles séricos de IL-6 en enfermos con melanoma y la carga tumoral (*Mouawad y cols, 1996*). Por tanto, la elevación de la IL-6 sérica en enfermos con melanoma se correlaciona también con la progresión de la enfermedad y con menores tasas de supervivencia (*Deichmann y cols, 2000*), y puede predecir una falta de respuesta a la inmunoterapia (*Mouawad y cols, 1999*). Esto último se puede explicar con el concepto, ya descrito, de resistencias cruzadas a múltiples citoquinas por parte de las células de melanoma (*Kerbel, 1992*). Nuestros resultados parecen apoyar lo referenciado en la literatura, es decir, que un aumento de la IL-6 sérica se asocia con una mayor mortalidad en los enfermos con melanoma (*Deichmann y cols, 2000*). En consecuencia, la medición seriada de los niveles séricos de IL-6 podría tener valor predictivo del pronóstico de los pacientes con melanoma y, por tanto, ser útil en el seguimiento de los mismos. Tras un aumento marcado de los niveles de IL-6 sérica, se debería estar más alerta ante la posible aparición de metástasis sistémicas. En estos casos, podría ser aconsejable acortar el intervalo entre las revisiones médicas o realizar exploraciones complementarias más exhaustivas.

Como ya es conocido, la IL-10 es capaz de suprimir las funciones de los distintos tipos de linfocitos T y de los macrófagos, con lo cual puede funcionar como una citoquina supresora de la respuesta inmunitaria e inflamatoria (*Taga y Tosato, 1992; Kambayashi y cols, 1995*). Estas acciones de la IL-10 parecen congruentes con el aumento de la IL-10 sérica, descrito por distintos autores, en pacientes con melanomas metastásicos (*Dummer y cols, 1995; Fortis y cols, 1996; Boyano y cols, 2000*). En un estudio con 11 pacientes con melanoma metastásico, se señaló que los niveles séricos de IL-10 estaban elevados (24,3 ng/mL de valor medio) en más del 60% de los enfermos, en comparación con los sujetos sanos (3,4 ng/mL de valor medio) (*Fortis y cols, 1996*). Es posible que la IL-10 sea capaz de habilitar al tumor para evitar o modular el ataque del sistema inmunitario, mediante un efecto inmunosupresor (*Sato y cols, 1996*).

Las diferencias observadas en los niveles basales de IL-10 sérica en los pacientes estudiados en esta tesis parecen estar en consonancia con lo ya publicado. Aunque no se pudo demostrar una relación entre dichos niveles y el espesor de Breslow, sí se observó una elevación de la IL-10 sérica en el grupo de

enfermos que fallecieron durante el periodo de seguimiento así como en el grupo de pacientes que desarrollaron metástasis viscerales (tablas XX y XXI; figura 23). Curiosamente, el aumento relativo observado en la IL-10 sérica basal en los grupos de enfermos con peor pronóstico se fue atenuando con el transcurso de los meses (figura 23). De este modo, pasado el primer año desde el diagnóstico del melanoma, se igualaron los niveles séricos de IL-10 en todos los pacientes independientemente del desarrollo de metástasis (tabla XXI y figura 23). No resulta fácil comprender este comportamiento de la IL-10 sérica en los pacientes de nuestra serie. El papel de la IL-10 como reguladora de la respuesta inmunitaria frente al melanoma no parece tan simple. El pronóstico más pobre que se ha atribuído a los melanomas que se asocian con niveles séricos elevados de IL-10 (*Dummer y cols, 1995; Boyano y cols, 2000; Nemunaitis y cols, 2001*), no ha sido confirmado por todos los autores. Así, se ha documentado que la IL-10 puede inhibir el crecimiento de las células de melanoma humano, suprimiendo la aparición de metástasis, gracias a su efecto antiangiogénico (*Huang y cols, 1996*). Además, la IL-10 es capaz de ejercer un efecto antitumoral a través de un mecanismo dependiente de las células NK (*Zheng y cols, 1996*). En este sentido, en modelos murinos, se ha visto que la administración sistémica de IL-10 puede inducir una respuesta inmunitaria efectiva y específica contra células de diversos tumores, entre ellos el melanoma (*Berman y cols, 1996*). Tanto el efecto antiangiogénico como el efecto inductor de las células NK, pueden explicar el posible papel positivo de la IL-10 en los pacientes con melanoma. En otras neoplasias, como el mieloma múltiple, se ha demostrado que los niveles más elevados de IL-10 sérica no sólo no implican una peor evolución sino que están asociados con un buen pronóstico (*Merville y cols, 1992*).

A modo de resumen, según lo observado en nuestra serie, la determinación de las citoquinas de tipo Th2 (IL-6 e IL-10) en el suero de pacientes con melanoma podría ser útil en el seguimiento clínico de dichos enfermos y servir como factor predictivo de la mejor o peor evolución de la enfermedad. Por el contrario, la determinación de los niveles séricos de las citoquinas de tipo Th1 (IL-15 e INF γ), no parece de tanta utilidad a la hora de orientar sobre el pronóstico. La IL-10 sérica proporcionaría información pronóstica desde el momento inicial, cercano a la extirpación del tumor, en el sentido de un peor pronóstico para los enfermos con niveles séricos basales de IL-10 elevados. Sin embargo, en las

sucesivas muestras los niveles séricos de IL-10 no son fiel reflejo de la aparición de metástasis. En el caso de la IL-6 sérica, lo que parece más interesante es su determinación seriada, pues es su aumento desde valores más bajos el que podría servir como marcador de mal pronóstico. En cualquier caso, la realización de medidas repetidas de los niveles séricos tanto de IL-6 como de IL-10 en pacientes con melanoma, podría tener aplicación en la práctica clínica, aportando información adicional a la del espesor de Breslow para emitir un pronóstico vital. Dicha información resultaría más dinámica que el mencionado índice de Breslow y vendría a reflejar una parcela del estado del sistema inmunitario del sujeto portador del melanoma y de la interacción entre el huésped y el tumor. Además debería investigarse si los niveles séricos de IL-6 y/o IL-10 pueden servir para monitorizar el efecto de la inmunoterapia en pacientes con melanoma.

Los estudios acerca del polimorfismo en las regiones reguladoras de los genes de citoquinas en pacientes con melanoma son muy escasos (*Howell y cols, 2001*), pero potencialmente pueden aportar mucha información, como se ha visto con otras enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (*Lazarus y cols, 1997; Schotte y cols, 2001*) o la diabetes mellitus (*Jahromi y cols, 2000*). Por eso se tomó la determinación de analizar dicho polimorfismo en los pacientes de esta serie constituyendo el cuarto objetivo de esta tesis.

En el caso del $\text{INF}\gamma$, se ha considerado que puede existir una distribución bimodal de los individuos, según la cantidad de proteína secretada sea alta o baja (*Cartwright y cols, 1999*), quedando entre ambos grupos los individuos con un nivel intermedio de secreción de dicha citoquina. Sin embargo, se ha publicado que no existe una relación demasiado estrecha entre el **polimorfismo de $\text{INF}\gamma$** y los niveles secretados de dicha citoquina (*Cartwright y cols, 1999*). En nuestros pacientes, tampoco se demostró correlación entre los niveles séricos de $\text{INF}\gamma$ y los distintos genotipos según el polimorfismo en la posición +874 del intrón del $\text{INF}\gamma$. En general, no están claros los factores que determinan los niveles de $\text{INF}\gamma$, y parece que no es tan importante como para otras citoquinas la relación entre el polimorfismo en la región reguladora del gen del $\text{INF}\gamma$ y la secreción de esta citoquina (*Cartwright y cols, 1999*).

En nuestra serie no apareció ningún individuo de fenotipo bajo secretor de $\text{INF}\gamma$ (A/A) en el grupo de pacientes que fallecieron, ni en los que desarrollaron

metástasis regionales o viscerales (tabla XXII). Aunque estos resultados requieren confirmación en series más amplias, parecen indicar que el fenotipo alto secretor de IFN γ tendría un peor pronóstico. Esto concordaría con un trabajo reciente que ha señalado que los pacientes con melanoma que poseen niveles séricos más elevados de IFN γ tienen un mayor riesgo de recurrencia del tumor, en comparación con aquellos enfermos cuyos niveles séricos de IFN γ son indetectables (*Porter y cols, 2001*).

El estudio del **polimorfismo en el promotor de la IL-6**, mostró que todos los pacientes de nuestra serie correspondían al fenotipo secretor alto de esta citoquina, pues siempre aparecía al menos una guanina en el par de bases de la posición -174 del promotor de la IL-6 (G/G o G/C). Por tanto, no se pudieron demostrar diferencias fenotípicas en función de la capacidad de secreción de IL-6. En cambio, sí resultó llamativo que todos los individuos que fallecieron y todos los que desarrollaron metástasis viscerales presentaban una guanina y una citosina en la posición -174 de la región promotora del gen de la IL-6, es decir, eran heterocigotos (G/C) (tabla XXIII). Según estos datos, se podría plantear la posibilidad de que los sujetos heterocigotos (G/C) para la posición -174 del promotor de la IL-6, pueden tener una predisposición para una peor evolución del melanoma.

Recientemente han aparecido diversas publicaciones que resaltan la importancia funcional del polimorfismo en el promotor de la IL-6 en relación con diversas patologías. Por ejemplo, el genotipo C/C se ha asociado con menor resorción ósea y menos riesgo de aparición de osteoporosis en mujeres menopáusicas (*Ferrari y cols, 2001*), y también se ha relacionado con menor probabilidad de desarrollar diabetes mellitus de tipo I (*Jahromi y cols, 2000*). Sin embargo, dicho genotipo C/C no parece asociarse significativamente con la susceptibilidad para padecer otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso (*Scottie y cols, 2001*). Sería interesante dilucidar si los individuos con fenotipo bajo secretor de IL-6, correspondiente con el genotipo homocigoto C/C, tienen menos predisposición para padecer un melanoma, pues ningún paciente de nuestra serie presentaba dicho genotipo. Hasta ahora, no hemos encontrado ningún estudio de este tipo en pacientes con melanoma. Sí existen datos relativos al mieloma múltiple, de modo que no se ha conseguido probar una asociación entre el polimorfismo en el promotor de la IL-6 y la susceptibilidad a padecer dicha

enfermedad (*Zheng y cols, 2000*), a pesar de que se considera que la IL-6 está implicada en la patogenia del mieloma múltiple (*Zhang y cols, 1989*).

El **polimorfismo en el promotor de la IL-10** es más complejo que el de las citoquinas anteriores, pues se puede producir una combinación de mutaciones en tres posiciones (-1082, -819 y -592) de dicho promotor, lo cual da lugar a tres fenotipos secretores de IL-10 (alto, intermedio y bajo) (*Turner y cols, 1997; Perrey y cols, 1998*). Este componente genético es el principal responsable de las variaciones en la producción de IL-10 observadas entre distintos individuos (*Westendorp y cols, 1997*).

El estudio del polimorfismo en el promotor de la IL-10, en los enfermos de nuestra serie, mostró que la mayoría de pacientes pertenecían al fenotipo secretor intermedio de dicha citoquina. Sin embargo, los pacientes que fallecieron pertenecían mayoritariamente al fenotipo de baja secreción de IL-10, el cual estaba mucho menos representado en los sujetos que permanecían vivos al final del estudio (75% vs 31%). También conviene destacar que ninguno de los pacientes fallecidos ni de los que desarrollaron metástasis viscerales o regionales presentaba el fenotipo secretor alto de IL-10 (tabla XXIV).

Nuestros resultados parecen apoyar la idea de que la IL-10 podría ejercer un efecto beneficioso sobre los pacientes con melanoma, hecho ya apuntado por otros autores, los cuales han resaltado el papel inhibitor de la angiogénesis por parte de la IL-10 (*Huang y cols, 1996*) o su acción potenciadora de la actividad de células NK (*Zheng y cols, 1996*). El efecto antiangiogénico de la IL10 se debe a la inhibición de la síntesis tanto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como de la IL-1 β , TNF α , IL-6 y metaloproteinasa-9 en los macrófagos asociados al tumor, que también desempeñan un papel crucial en la angiogénesis tumoral (*Howell y cols, 2001*).

Recientemente, se ha publicado un trabajo que valoraba la posible relación entre el polimorfismo en el promotor de la IL-10 y la susceptibilidad a desarrollar un melanoma o el pronóstico de dicha enfermedad (*Howell y cols, 2001*). Estos autores han demostrado un incremento significativo del fenotipo bajo secretor de IL-10 (genotipo A/A, -1082) en sujetos con melanoma y, dentro de ellos, con los melanomas de mayor espesor y con los estadios más avanzados de la enfermedad; por el contrario, el fenotipo secretor alto de IL-10 (genotipo -1082

G/G) se ha asociado con melanomas no invasivos en fase de crecimiento horizontal (Howell y cols, 2001).

En nuestra serie, teniendo en cuenta el polimorfismo en las tres posiciones -1082, -819 y -592 del promotor de la IL-10, se demostró que el **genotipo ACC/ATA**, asociado con baja secreción de IL-10, se correlacionaba significativamente con una menor supervivencia (ver figura 24). Este genotipo también era más frecuente en los melanomas de mayor espesor que en los de menor espesor, de modo análogo a lo descrito por otros autores para el genotipo G/G en la posición -1082 (Howell y cols, 2001); no obstante, en nuestros pacientes, estas diferencias no han llegado a ser significativas (tabla XXIV).

Nuestros datos no han podido demostrar que exista una concordancia entre el polimorfismo en el promotor de la IL-10 y los niveles séricos de esta citoquina. No obstante, la atribución por otros autores de cada fenotipo secretor a su correspondiente genotipo, se ha realizado a través de estudios *in vitro*, cuyas condiciones no reproducen exactamente lo que ocurre *in vivo*. Es posible que la falta de correlación *in vivo* no se deba tanto al nivel de secreción de IL-10 como a la mayor velocidad de consumo de esta citoquina. Por tanto, pensamos que sería conveniente poder verificar este aspecto en futuros experimentos aplicados al caso de enfermos con melanoma.

Según lo anterior, los genotipos que han sido asociados con mayores niveles de secreción de IL-10 *in vitro*, pueden implicar un mejor pronóstico en pacientes con melanoma cutáneo. Por el contrario, los genotipos de baja expresión de IL-10, especialmente el ACC/ATA, podrían servir como factor predictivo de peor pronóstico de la enfermedad.

A la vista de estos resultados, sería interesante la continuación del estudio en un mayor número de pacientes con melanoma y su comparación con lo que ocurre con individuos sanos, de modo que se pueda establecer claramente el carácter de susceptibilidad o protección, y la posible relación con el pronóstico, que tienen los distintos genotipos que determinan el polimorfismo de diversas citoquinas, fundamentalmente de tipo Th2.

VI. CONCLUSIONES

1. La intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral y el tipo celular de melanoma pueden ser considerados como datos histológicos de interés, cuyo conocimiento puede ayudar a establecer de modo más preciso el pronóstico de pacientes con dicho tumor. En este sentido, tanto la ausencia de infiltrado inflamatorio como la variante de celularidad atípica parecen asociarse con una menor supervivencia.

2. La determinación seriada del cociente CD4/CD8 podría orientar sobre la evolución y pronóstico de los enfermos con melanoma, pues dicho cociente descendió significativamente con el aumento del espesor de Breslow y en los pacientes que fallecieron antes de completar el periodo de estudio. Su determinación podría servir para el seguimiento del paciente, pero no como factor predictivo desde el inicio de la enfermedad.

3. En pacientes con melanoma, el descenso de la población CD4⁺CD28⁺ y el aumento de la población CD8⁺CD28⁻ puede traducir un estado de anergia y se asocia con un mal pronóstico (mayor espesor tumoral, baja supervivencia y desarrollo de metástasis). A diferencia de la población CD4⁺CD28⁺, las modificaciones en el número de células CD8⁺CD28⁻ pueden permitir una visión prospectiva desde el inicio de la enfermedad, de modo que un cociente CD8⁺CD28⁺ / CD8⁺CD28⁻ superior a 1,5 podría ser indicativo de buen pronóstico y viceversa.

4. La monitorización de los linfocitos CD19⁺CD80⁺ podría constituir un marcador precoz de la evolución de la enfermedad. La detección de cifras más elevadas de células CD19⁺CD80⁺ y CD19⁺CD80⁺CD86⁺ se asocia con melanomas de menor espesor, con una mayor supervivencia y con una menor frecuencia de metástasis. De este modo, los valores medios de las células

CD19⁺CD80⁺ en los pacientes con melanomas de mejor pronóstico llegaron a alcanzar cifras iguales o superiores al doble que las detectadas en enfermos con peor pronóstico. Además, un descenso en la expresión de CD80 paralelo a una inducción de CD86 en las células CD19⁻, se relaciona con un peor pronóstico.

5. La detección precoz de un mayor número de células CD14⁻CD40⁺ con expresión alta de HLA de clase I, o mejor aún, un cociente CD14⁻CD40⁺HLA-I^{alto} / CD14⁻CD40⁺HLA-I^{bajo} mayor de 0,5 puede constituir un factor predictivo de buen pronóstico en pacientes con melanoma.

6. La detección precoz de un aumento en las cifras de células con fenotipo CD3⁺CD16/56⁺CD8⁻ se relaciona con una mayor mortalidad y puede ser representativa de un mal pronóstico.

7. En función de la expresión de CD8, se pueden distinguir dos subtipos de células CD3⁻CD16/56⁺ (células NK), cuya distribución y valores absolutos pueden orientar sobre la supervivencia de los pacientes con melanoma. La presencia de cifras bajas de células CD3⁻CD16/56⁺CD8⁺ se asocia con una menor supervivencia.

8. La medida de los niveles séricos de citoquinas de tipo Th2, en concreto, IL-6 e IL-10, parece más útil que la de citoquinas de tipo Th1, para realizar el seguimiento de pacientes con melanoma. Los niveles séricos elevados de IL-10 al comienzo de la enfermedad o de IL-6 de modo más tardío, podrían estar relacionados con una peor evolución.

9. El polimorfismo en las regiones reguladoras de los genes de algunas citoquinas, como la IL-10, se podría asociar con una distinta respuesta individual frente al melanoma. Al considerar el polimorfismo en los tres puntos de mutación

(- 1082, - 819, - 592) descritos en el promotor de la IL-10, el genotipo ACC/ATA se relaciona con una menor supervivencia de los enfermos con melanoma.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Ackerman AB. Mythology and numerology in the sphere of melanoma. *Cancer* 2000;88:491-496.

Adams PW, Lee HS, Waldman WJ y cols. Alloantigenicity of human endothelial cells. Frequency and phenotype of human T helper lymphocytes that can react to allogeneic endothelial cells. *J Immunol* 1992;148:3753-3760.

Ahmed I. Malignant melanoma: prognostic indicators. *Mayo Clin Proc* 1997;72:356-361.

Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T y cols. Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol Immunol* 2000;37:515-526.

Álvarez R. Inmunología y trasplante: ámbito histórico y proyección en la investigación científica. En: Álvarez R (ed), *Inmunología del trasplante hepático*. Síntesis: Madrid, 1997, pp 34-55.

Álvarez-Mon M, Camacho F, Díaz JL y cols. Epidemiología. En: *Panorámica actual del melanoma*. Acción Médica: Madrid, 1997, pp 17-23.

Andalib AR, Lawry J, Ali SA y cols. Cytokine modulation of antigen expression in human melanoma cell lines derived from primary and metastatic tumour tissues. *Melanoma Res* 1997;7:32-42.

Armstrong BK, Krickler A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1994;19-20:219-240.

Awad MR, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Polymorphism in the TGF- β 1 gene. *Eur J Immunogenet* 1997;24:45.

Azzarone B, Pottin-Clemenceau C, Krief P y cols. Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for non-hematopoietic cells? *Eur Cytokine Netw* 1996;7:27-36.

Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;177:845-850.

Balch CM, Soong SJ, Murad TM y cols. A Multifactorial analysis of melanoma. Prognostic factors in melanoma patients in lymph node metastases (stage II). *Ann Surg* 1981;193:377-388.

Balch CM, Soong SJ, Murad TM y cols. A multifactorial analysis of melanoma. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). *J Clin Oncol* 1983;1:126-134.

Balch CM, Soong SJ, Shaw HM y cols. An analysis of prognostic factors in 8.500 patients with cutaneous melanoma. In: Cutaneous melanoma, 2nd edition. Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong SJ (eds). JB Lippincott: Philadelphia, 1992, pp 165-187.

Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB y cols. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 2000;88:1484-1491.

Bamford RN, Tagaya Y, Waldmann TA. Interleukin 15. What it does and how it is controlled. *Immunologist* 1997;5/2:52-56.

Barth A, Wanek LA, Morton D. Prognostic factors in 1.521 melanoma patient with distant metastases. *J Am Coll Surg* 1995;181:193-201.

Barzegar C, Meazza R, Pereno R y cols. IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. *Oncogene* 1998;16:2503-2512.

Becker JC, Brabletz T, Czerny C, Termeer C, Bröcker EB. Tumor escape mechanism from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4⁺ human T cell clone by the autologous MHC class II⁺ melanoma. *Int Immunol* 1993;5:1501-1508.

Becker JC, Terheyden P, Bröcker EB. Molecular basis of T-cell dysfunction in melanoma. *Melanoma Res* 1997;7:S51-S57.

Becker JC, Vetter CS, Schrama D y cols. Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node. *Eur J Immunol* 2000;30:3699-3706.

Beissert S, Bluestone JA, Mindt I y cols. Reduced ultraviolet-induced carcinogenesis in mice with a functional disruption in B7-mediated costimulation. *J Immunol* 1999;163:6725-6731.

Berman RM, Suzuki T, Tahara H y cols. Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific and long-lasting immune response against established tumors in mice. *J Immunol* 1996;157:231-238.

Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1995;182:639-641.

Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2001;60:523-526.

Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 1992;20:315-322.

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997;18:267-268.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM. The role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev* 1996;153:5-26.

Boyano MD, García-Vazquez MD, López-Michelena T y cols. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *Br J Cancer* 2000;83:847-852.

Breslow A. Thickness, cross-sectioned area and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-908.

Bröcker EB, Zwadlo G, Holzman B, Macher E, Sorg C. Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *Int J Cancer* 1988;41:562-567.

Brodsky FM, Lem L, Bresnahan A. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 1996;47:464-471.

Buelens C, Willems F, Delvaux A y cols. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2668-2672.

Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G y cols. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 1997;185:2053-2060.

Carrel S, Schmidt Kessen A, Giuffrè L. Recombinant interferon-gamma can induce the expression of HLA-DR and -DC on DR-negative melanoma cells and enhance the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *Eur J Immunol* 1985;15:118-123.

Cartwright N, Demaine A, Jahromi M, Sanders H, Kaminski ER. A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and INF-G gene polymorphisms in normal individuals. *Transplantation* 1999;68:1546-1552.

Cascinelli N, Vaglini m, Bufalino R y cols. BANS: A cutaneous region with no prognostic significance in patients with melanoma. *Cancer* 1986;57:441-444.

Ceballos P, Ruiz-Maldonado R, Mihm MC. Melanoma in children. *N Engl J Med* 1995;9:656-662.

Chambers CA, Krummel MF, Boitel B y cols. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev* 1996;153:27-46.

Chambers CA, Allison JP. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:396-404.

Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:203-210.

Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991;147:528-534.

Chen Y-T, Dubrow R, Zheng T, Barnhill RL, Fine J, Berwick M. Sunlamp use and the risk of cutaneous malignant melanoma: a population-based case-control study in Connecticut, USA. *Int J Epidemiol* 1998;27:758-765.

Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biological behaviour of primary malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-726.

Clark WJ, Elder DE, Guerry D y cols. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathol* 1984;15:1147-1165.

Clark WH, Elder DE, Guerry D y cols. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1893-1904.

Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994, 367: 425-428.

Cochran AJ, Elashoff D, Morton DL, Elashoff R. Individualized prognosis for melanoma patients. *Hum Pathol* 2000;31:327-331.

Cohen C, DeRose PB, Campbell WG, Schlosnagle DC, Sgoutas D. Estrogen receptor status in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1990;12:562-564.

Colloby PS, West KP, Fletcher A. Observer variation in the measurement of Breslow depth and Clark's level in thin cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 1991;163:245-250.

Colombo MP, Maccalli C, Mattei S, Melani S, Radrizzani M, Parmiani G. Local cytokine availability elicits tumor rejection and systemic immunity through granulocyte-T lymphocyte cross-talk. *Cancer Res* 1992;52:4853-4857.

Colovai AI, Ciubotariu R, Liu R, Cortesini R, Suci-Foca N. CD8⁺ CD28⁻ T suppressor cells a distinct subset in a heterogeneous population. *Transplant Proc* 2001;33:104-107.

Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC y cols. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 2001;97:3146-3151.

Costello RT, Gastaut JA, Olive D. What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy?. *Immunol Today* 1999;20:488-492.

Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson IV, Woo P. Polymorphic haplotypes of the IL-10 5' flanking region determine variable IL-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1101-1108.

Croft M, Joseph SB, Miner KT. Partial activation of naive CD4 T cells and tolerance induction in response to peptide presented by resting B cells. *J Immunol* 1997;159:3257-3265.

Crombie IK. Distribution of malignant melanoma of the body surface. *Br J Cancer* 1981;43:843-849.

Day CL, Lew RA, Mihm MC y cols. A multivariate analysis of prognostic factors for melanoma patients with lesions greater than or equal to 3.65 mm in thickness. The importance of revealing alternative Cox models. *Ann Surg* 1982;195:44-49.

De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H y cols. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.

Deichmann M, Benner A, Waldmann V, Bock M, Jäckel A, Näher H. Interleukin-6 and its surrogate C-reactive protein are useful serum markers for monitoring metastasized malignant melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:301-307.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna P, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150:353-360.

Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real. Data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and End Results Program Registry. *Arch Dermatol* 1999;135:275-280.

Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP y cols. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med* 1999, 5:7, 774-779.

Ding L, Shevach EM. Activated B cells express CD28/B7-independent costimulatory activity. *J Immunol* 1996;157:1389-1396.

Dobrzanski MJ, Reome JB, Dutton RW. Immunopotentiating role of INF-gamma in early and late stages of type 1 CD8 effector cell-mediated tumor rejection. *Clin Immunol* 2001;98:70-84.

Donawho CK, Pride MW, Kripke ML. Persistence of immunogenic pulmonary metastases in the presence of protective anti-melanoma immunity. *Cancer Res* 2001;61:215-221.

- Dubois PM, Pihlgren M, Tomkowiak M, Van Mechelen M, Marvel J. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1998;161:5260-5267.
- Dugas B, Mossalayi MD, Damais C, Kolb JP. Nitric oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23. *Immunol Today* 1995;16:574-580.
- Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995;5:67-68.
- Dummer R, Yue FY, Pavlovic J y cols. Immune stimulatory potential of B7.1 and B7.2 retrovirally transduced melanoma cells: suppression by interleukin 10. *Br J Cancer* 1998;77:1413-1419.
- Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 1994;15:406-411.
- Effros RB. Costimulatory mechanisms in the elderly. *Vaccine* 2000;18:1661-1665.
- Elder DE, Guerry D, VanHorn M y cols. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). *Cancer* 1985;56:413-418.
- Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 1992;149:92-95.
- Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Claudy A, Touraine JL. Skin cancers in organ transplant recipients. *Ann Transplant* 1997;2:28-32.
- Falk, C.S. Steinle A and Schendel, D.J. Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to alloespecific natural killer cells. *J Exp Med* 1995;182:1005-1018.
- Ferrari SL, Garnero P, Edmond S, Montgomery H, Humphries SE, Greenspan SL. A functional polymorphic variant in the interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women. *Arthritis Rheum* 2001;44:196-201.
- Ferrarini M, Imro MA, Sciorati C y cols. Blockade of the Fas-triggered intracellular signaling pathway in human melanomas is circumvented by cytotoxic lymphocytes. *Int J Cancer* 1999;81:573-579.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cells. IV Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095.

Fisher IR, Neifeld JP, Lippman ME. Estrogen receptor in human malignant melanoma. *Lancet* 1976;2:337-339.

Fortea JM. Histopronóstico del melanoma maligno. Estudio de 168 casos. Tesis Doctoral. Valencia, 1987.

Fortis C, Foppoli M, Gianotti L y cols. Increased interleukin-10 levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett* 1996;104:1-5.

Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A y cols. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995;2:523-532.

Galle PR, Hoffman WJ, Walczak K. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182:1223-1230.

Gamero AM, Ussery D, Reintgen DS, Puleo CA, Djeu JY. Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism. *Cancer Res* 1995;55:4988-4994.

Garbe C, Krasagakis K, Zouboulis CC y cols. Antitumor activities of interferon alpha, beta and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis and immunophenotype. *J Invest Dermatol* 1990;95:231S-237S.

Garbe C, Krasagakis K. Effects of interferons and cytokines on melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1993;100:239S-244S.

García-Alonso A, Minguela A. Interacción T-B: moléculas coestimuladoras y mecanismos de activación celular. En: Álvarez R (ed), *Inmunología del trasplante hepático*. Síntesis: Madrid, 1997, pp 149-169.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T y cols. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18:89-95.

Geertsen R, Hofbauer G, Kamarashev J, Feng-Yun Y, Dummer R. Immune escape mechanisms in malignant melanoma. *Int J Mol Med* 1999;3:49-57.

Genc K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80+ B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest* 1997;99:2664-2671.

Ginarte M, Toribio J. Epidemiología del melanoma cutáneo primario. *Piel* 2000;15:414-418.

Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ y cols. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995;14:3654-3663.

- Gordon LG, Lowry WS, Pedlow PJ, Patterson CC. Poor prognosis for malignant melanoma in Northern Ireland: a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1991;63:283-286.
- Goronzy JJ, Weyand CM. Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol* 2001;22:251-255.
- Greenfield EA, Howard E, Paradis T y cols. B7.2 expressed by T cells does not induce CD28-mediated costimulatory activity but retains CTLA4 binding: implications for induction of antitumor immunity to T cell tumors. *J Immunol* 1997;158:2025-2034.
- Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998;16:111-135.
- Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma. *Cancer* 1978;42:2282-2292.
- Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:35-42.
- Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992;356:607-609.
- Harrist TJ, Rigel DS, day CL y cols. Microscopic satellites are more highly associated with regional lymph nodes metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer* 1984;53:2183-2187.
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today* 1990;11:443-449.
- Holland SM, Gallin JI. Trastornos de los granulocitos y monocitos. En: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ y cols. (eds), Harrison. *Principios de Medicina Interna*, vol 1. McGraw-Hill-Interamericana: Madrid, 1998, pp 398-409.
- Hollsberg P, Scholz D, Anderson E y cols. Expression of a hypoglycosylated form of CD86 (B7-2) on human T cells with altered binding properties to CD28 and CTLA-4. *J Immunol* 1997;159:4799-4805.
- Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* 2001;13:134-140.
- Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2001;2:25-31.
- Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res* 1996;2:1969-1979.

Huard B, Karlsson L. A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol*, 2000;30:1665-1675.

Hung K, Hayashi R, Lafondy-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitskiy H. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998;188:2357-2368.

Hutchinson IV, Pravica V, Hajeer A, Sinnott PJ. Identification of high and low responders to allografts. *Rev Immunogenetics* 1999;1:323-333.

Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:885-888.

Janeway CA, Carding S, Jones B y cols. CD4+ T cells: specificity and function. *Immunol Rev* 1998;101:39-80.

Jatoi I, Gore ME. Sex, pregnancy, hormones and melanoma. *BMJ* 1993;307:2-3.

Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Ellis J, Bonnefoy JY. CD86 (B7-2) on human B cells. *J Biol Chem* 1997;272:15613-15619.

Jeannin P, Herbault N, Delneste Y y cols. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J Immunol* 1999;162:2044-2048.

Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP y cols. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human lymphocytes. *Immunity* 2000;13:303-312.

Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. *J Immunol* 1995;154:3383-3390.

Kelfkens G, de Gruijl FR, van der Leun JC. Ozone depletion and increase in annual carcinogenic ultraviolet dose. *Photochem Photobiol* 1990;52:819-823.

Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS. Regression in malignant melanoma: a histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* 1985;56:2287-2291.

Kerbel RS. Expression of multi-cytokine resistance and multigrowth factor independence in advanced stage metastatic cancer. Malignant melanoma as a paradigm. *Am J Pathol* 1992;141:519-524.

Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989;74:1-10.

Kishimoto T, Akira S. Interleukin-6 and its receptor, a paradigm for cytokines. *Science* 1992;258:593-597.

- Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625-630.
- Koh HK, Michalik E, Sober AJ y cols. Lentigo malignant melanoma has no better prognosis than other types of melanoma. *J Clin Oncol* 1984;2:994-1001.
- Koh HK. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1991;325:171-182.
- Kooy AJ, Prens EP, Van Heukelum A, Vuzevski VD, Van Joost T, Tank B. Interferon-gamma-induced ICAM-1 and CD40 expression, complete lack of HLA-DR and CD80 (B7.1), and inconsistent HLA-ABC expression in basal cell carcinoma: a possible role for interleukin-10?. *J Pathol* 1999;187:351-357.
- Kopf AW, Welkovich B, Frankel RE y cols. Thickness of malignant melanoma: global analysis of related factors. *J Dermatol Surg Oncol* 1987;13:345-390.
- Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal-Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class-II peptide complexes at the membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 1997;7:861-871.
- Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995;182:459-465.
- Kuchroo VK, Das MP, Brown JA y cols. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathway: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707-718.
- Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. Immunodeficiency due to a faulty interaction between T cells and B cells. *Curr Opin Immunol* 1994;6:636-641.
- Langley RGB, Barnhill RL, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms: cutaneous melanoma. En: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K y cols. (eds), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 5^a ed, vol 1. McGraw-Hill: New York, 1999, pp 1080-1116.
- 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.
- Lanier LL. Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 1997;6:371-378.
- Lapointe R, Toso JF, Butts C, Young HA, Hwu P. Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2000;30:3291-3298.
- Larsen TE, Grude TH. Relation of cross sectional profile, level of invasion, ulceration and vascular invasion to tumor type and prognosis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1979;87:242-253.

- Lazarus M, Hajeer AH, Turner D y cols. Genetic variation in the interleukin 10 gene gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997;24:2314-2317.
- Lecavalier MA, From L, Gaid N. Absence of estrogen receptors in dysplastic nevi and malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:242-246.
- Lechler RI, Simpson E, Bach FH. Major and minor histocompatibility antigens: An introduction. En: Bach FH y Auchincloss H (eds), *Transplantation Immunology*. Willey-Liss, New York, 1995.
- Lee PP, Yee C, Savage PA y cols. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999;5:677-685.
- Leon P, Daly JM, Synnestvedt M, Schultz DJ, Elder DE, Clark WH. Prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. *Arch Surg* 1991;126:1461-1468.
- Leveque L, Dalac S, Domp martin A y cols. Melanoma in organ transplant patients. *Ann Dermatol Venereol* 2000;127:160-165.
- Levy Y, Tsapis A, Brouet JC. Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J Clin Invest* 1991;88:696-699.
- Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suciú-Foca N. T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol* 1999;163:6386-6392.
- Lindelof B, Sigurgeirsson B, Gabel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol* 2000;143:513-519.
- Litwin V, Gumperz J, Parham P y cols. Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J Exp Med* 1993;178:1321-1336.
- Liu Y. Is CTLA-4 a negative regulator for T-cell activation?. *Immunol Today* 1997;18:569-572.
- Liu L, Kuchroo VK, Weiner HL. B7-2 (CD86) but not B7-1 (CD80) costimulation is required for the induction of low dose oral tolerance. *J Immunol* 1999;163:2284-2290.
- Lopez-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999;11:301-307.
- Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, Halliday GM. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1997;108:914-919.

Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 1993;120:1281-1288.

Lu C, Vickers MF, Kerbel RS. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:9215-9219.

Mackensen A, Wittnebel S, Veelken H, Noppen C, Spagnoli GC, Lindermann A. Induction and large-scale expansion of CD8+ tumor specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood lymphocytes by in vitro stimulation with CD80-transfected autologous melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* 1999;10:3,329-336.

Maeda A, Aragane Y, Tezuka T. Expression of CD95 ligand in melanocytic lesions as a diagnostic marker. *Br J Dermatol* 1998;139:198-206.

Maggi E, Parronchi P, Manetti R y cols. Reciprocal regulatory effects of INF-gamma and IL-4 on the in vivo development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992;148:2142-2147.

Magnus K. Prognosis in malignant melanoma of the skin. *Cancer* 1977;40:389-397.

Mansson-Brahme E, Carstensen J, Erhardt K, Lagerlof B, Ringborg U, Rutqvist LE. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1994;73:2324-2332.

Mantovani A, Botazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992;13:265-270.

Marín L. Procesamiento y presentación de antígenos. Bases del reconocimiento alogénico. En: Álvarez R (ed), *Inmunología del transplante hepático*. Síntesis: Madrid, 1997, pp 121-146.

Marks R. Epidemiology of melanoma. *Exp Dermatol* 2000;25:459-463.

Markus NR, Rosenberg SA, Topalian SL. Analysis of cytokine secretion by melanoma-specific CD4⁺ T lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:739-746.

McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW y cols. Cell type and pigment content as prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. En Ackerman AB (ed), *Pathology of malignant melanoma*. Masson: New York 1981, pp 341-345.

Medina MC, Pérez A, Pérez S. Sistema inmune y cáncer. *Inmunología* 1996;15:37-58.

Merville P, Rousset F, Banchereau J, Klein B, Bacaille R. Serum interleukin 10 in early stage multiple myeloma. *Lancet* 1992;340:1544-1545.

- Metzler B, Burkhart C, Wraith DC. Phenotypic analysis of CTLA-4 and CD28 expression during transient peptide-induced T cell activation *in vivo*. *Int Immunol* 1999;11:667-675.
- Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996;273:70-74.
- Miller JG, Neil SM. Gender and cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 1997;136:657-665.
- Minguela A, Álvarez R. Citoquinas y sus receptores. En: Álvarez R (ed), *Inmunología del trasplante hepático*. Síntesis: Madrid, 1997, pp 171-185.
- Miyazono Y, Kamogawa Y, Ryo K y cols. Effect of B7.1-transfected human colon cancer cells on the induction of autologous tumour-specific cytotoxic T cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:10, 997-1003.
- Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
- Morton DL, Davtyan DG, Waneck LA, Foshag LJ, Cochran AJ. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. *Cancer* 1993;71:3737-3743.
- Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Patterns of interleukin-6 gene expression *in vivo* suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3092-3096.
- Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O y cols. Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin Cancer Res* 1996;2:1405-1409.
- Mouawad R, Khayat D, Merle S, Antoine EC, Gil-Delgado M, Soubrane C. Is there any relationship between interleukin-6/interleukin-6 receptor modulation and endogenous interleukin-6 release in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy?. *Melanoma Res* 1999;9:181-188.
- Mouawad R, Khayat D, Soubrane C. Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in advanced melanoma. *Melanoma Res* 2000;10:461-467.
- Nagai H, Har I, Horikawa T, Oka M, Kamidon S, Ichihashi M. Elimination of CD4+ T cells enhances anti-tumor effect of locally secreted interleukin-12 on B16 mouse melanoma and induce vitiligo-like color alteration. *J Invest Dermatol* 2000;115:1059-64.
- Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and mutations. *Immunol Today* 1995;16:39-43.

Natarajan K, Sahoo NC, Rao KVS. Signal thresholds and modular synergy during expression of costimulatory molecules in B lymphocytes. *J Immunol* 2001;167:114-122.

Nawrocki S, Mackiewicz A. Genetically modified tumour vaccines- where we are today. *Cancer Treat Rev* 1999;25:1,29-46.

Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest* 2001;19:239-247.

Nestle FO, Burg G, Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 1999;20:5-7.

Nielsen MB, Monsurro V, Migueles SA y cols. Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2000;165:2287-2296.

Noelle RJ. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukocyte Biol* 1998;63:418-428.

Noz KC, Bauwens M, Buul PPW, Vrolijk H y cols. Comet assay demonstrates a higher ultraviolet B sensitivity to DNA damage in dysplastic nevus cells than in melanocytic nevus cells and foreskin melanocytes. *J Invest Dermatol* 1996;106:1198-1202.

Pérez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng X, Strom B, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997;6:411-417.

Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 1995;13:399-415.

Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon- γ , interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor- α genes: a technical report. *Transplant Immunol* 1998;6:193-197.

Pichler WJ, Wyss-Coray T. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994;15:312-315.

Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini J-C, Romero P. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8⁺ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol* 2000;164:1148-1152.

Pontikes LA, Temple WJ, Cassar SL y cols. Influence of level and depth on recurrence rate in thin melanoma. *Am J Surg* 1993;165:225-228.

Popescu NA, Beard CM, Treacy PJ y cols. Cutaneous malignant melanoma in Rochester, Minnesota: Trends in incidence and survivorship 1950 through 1985. *Mayo Clin Proc* 1990;65:1293-1302.

Porter GA, Abdalla J, Lu M y cols. Significance of plasma cytokine levels in melanoma patients with histologically negative sentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2001;8:116-122.

Potestio M, Pawelec G, Di Lorenzo G y cols. Age-related changes in the expression of CD95 (APO1/FAS) on blood lymphocytes. *Experimental Gerontology* 1999;34:659-673.

Powne F, Coffman RL. Cytokine regulation of T-cell function, potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 1993;14:270-272.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production correlates with CA repeat polymorphism in the human interferon- γ gene. *Eur J Immunogenet* 1999;26:1-3.

Quirós-Roldán E, Sottini A, Signorini S, Primi D, Imberti L. Proliferaciones oligo/monoclonales de linfocitos T con morfología LGL. *Rev Esp Inmunol* 1996;16:123-128.

Rak JW, Hegmann EJ, Lu C, Kerbel RS. Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J Cell Physiol* 1994;159:245-255.

Reiter Z. Dual effects of cytokines in regulation of MHC-unrestricted cell mediated cytotoxicity. *CRC Crit Rev Immunol* 1993;13:1-34.

Rhodes AR. Dysplastic melanocytic nevi. En: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K y cols. (eds), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 5^a ed, vol 1. McGraw-Hill: New York, 1999, pp 1060-1079.

Richar J, Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor family members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994;6:407-413.

Richardson B, Price A, Wagner M y cols. Investigation of female survival benefit in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 1999;80:2025-2033.

Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 1996;34:839-847.

Rivoltini L, Barracchini KC, Viggiano V y cols. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1995;55:3149-3157.

Rivoltini L, Radrizzani M, Accornero P y cols. Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing. *J Immunol* 1998;161:3,1220-1230.

Robbins PF, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* 1996;8:628-636.

- Ródenas JM, Delgado-Rodríguez M, Herranz MT, Tercedor J, Serrano S. Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 1996;7:275-283.
- Ródenas JM, Delgado-Rodríguez M. Factores de riesgo en el melanoma cutáneo en una población del sur de España. *Actas Dermosifiliogr* 1996;87:243-252.
- Ródenas JM, Delgado-Rodríguez M, Fariñas-Alvarez C, Herranz MT, Serrano S. Melanocytic nevi and risk of cutaneous malignant melanoma in southern Spain. *Am J Epidemiol* 1997;145:1020-1029.
- Ródenas López JM. Factores de riesgo del melanoma cutáneo (y IV). Factores de riesgo ambientales: luz artificial y otros. *Piel* 1999;14:66-71.
- Ronan SG, Eng AM, Briele HA y cols. Thin malignant melanoma with regression and metastases. *Arch Dermatol* 1987;123:1326-1330.
- Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL y cols. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994;271:907-913.
- Rousset F, García E, Defrance T y cols. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci (Wash.)* 1992;89:1890-1893.
- Rubio G, García P. Fisiología de las células "natural killer" (NK). Posibles implicaciones en la respuesta a los trasplantes. En: R. Álvarez (ed), *Inmunología del trasplante hepático*. Ed. Síntesis: Madrid, 1997, pp 189-199.
- Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD-28 co-stimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 1997;158:658-665.
- Salman SM, Rogers GS. Prognostic factors in thin cutaneous melanoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1990;16:413-418.
- Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1351-1364.
- Sato T, McCue P, Masuoka K y cols. Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin Cancer Res* 1996;2:1383-1390.
- Sato T, McCue P, Masuoka K y cols. Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin Cancer Res* 1996;2:1383-1390.
- Schmoeckel CE, Braun-Falco O. Prognostic index in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1978;114:871-873.

Schoenberger SP, Toes REM, Vandervoort EIH, Offringa R, Melief CJM. T-cell help for cytotoxic T-lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998;393:480-483.

Schotte H, Schluter B, Rust S, Assman G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:393-400.

Seline PC, Norris DA, Horikawa T, Fujita M, Middleton MH, Morelli JG. Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanoma and following ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 1996;106:1320-1324.

Shaw HM, McCarthy SW, McCarthy WH y cols. Thin regressing malignant melanoma: significance of concurrent regional lymph node metastases. *Histopathology* 1989;15:257-265.

Shreedhar V, Giese T, Sung VW, Ullrich SE. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4 and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* 1998;160:3783-3789.

Shu U, Kiniwa M, Wu CY y cols. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immuno* 1995;25:1125-1128.

Silvenberg E, Boring CC, Squires TS. Cancer statistics, 1990. *CA* 1990;40:9-26.

Slingluff CL, Reintgen DS, Vollmer RT et al. Malignant melanoma arising during pregnancy. A study of 100 patients. *Ann Surg* 1990;211:552-7.

Slingluff CL. Lethal "thin" malignant melanoma. *Ann Surg* 1987;208:150-157.

Sober AJ, Day CL, Fitzpatrick TB y cols. early death from clinical stage I melanoma. *J Invest Dermatol* 1991;18:264-272.

Sondergaard K, Schou G. Survival with primary cutaneous malignant melanoma, evaluated from 2.012 cases. *Virchows Arch* 1985;406:179-195.

Soubrane C, Mouawad R, Antoine EC, Verola O, Gil-Delgado M, Khayat D. A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. *Br J Dermatol* 2000;143:307-312.

Speiser DE, Valmori D, Rimoldi D y cols. CD-28 negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol* 1999;29:1990-1999.

Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999;1:1634-1642.

- Stout RD, Suttles J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today* 1996;17:487-492.
- Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol* 1996;156:8-11.
- Strohal R, Marberger K, Pehamberger H, Stingl G. Immunohistological analysis of anti-melanoma host responses. *Arch Dermatol Res* 1994;287:28-35.
- Stuhler G, Schlossman SF. Antigen organization regulates cluster formation and induction of cytotoxic T lymphocytes by helper T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997;94:622-627.
- Sule-Suso J, Arienti F, Melani C, Colombo MP, Parmiani G. A B7-1-transfected human melanoma line stimulates proliferation and cytotoxicity of autologous and allogeneic lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995;25:2737-2742.
- Swerlick RA, Chen S. The melanoma epidemic: more apparent than real?. *Mayo Clin Proc* 1997;72:881-884.
- Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993;11:2964-2971.
- Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992;148:1143-1148.
- Tate PS, Ronan SG, Feutch KE y cols. Melanoma in childhood and adolescence: Clinical and pathological features of 48 cases. *J Ped Surg* 1993;28:217-222.
- Thomas PJ, Kaur JS, Aitcheson CT, Robinson WA, Tan EM. Antinuclear, antinucleolar, and anticytoplasmic antibodies in patients with malignant melanoma. *Cancer Res* 1983;43:1372-1380.
- Thomas WD, Hersey P. CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95). *Int J Cancer* 1998;75:384-390.
- Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M y cols. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 1996;183:1965-1971.
- Torío A, Moya R. Linfocitos T. El receptor de célula T. En: R. Álvarez (ed), *Inmunología del trasplante hepático*. Síntesis: Madrid, 1997, pp 67-83.
- Travers RL, Sober A, Bermick M y cols. Increased thickness of pregnancy-associated melanoma. *Br J Dermatol* 1995; 132: 876-883.
- Tsubata T, Wu J, Honjo T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 1993;364:645-648.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.

Ullrich SE. Modulation of immunity by ultraviolet radiation: key effects on antigen presentation. *J Invest Dermatol* 1995;105:30S-36S.

Vallejo AN, Nestel AR, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ. Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4+ T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J Biol Chem* 1998;273:8119-8129.

van der Esch EP, Cascinelli N, Preda F, Morabito A, Bufalino R. Stage I melanoma of the skin. Evaluation of prognosis according to histologic characteristics. *Cancer* 1981;48:1668-1673.

van Duinen SG, Ruiters DJ, Broecker EB y cols. Level of HLA antigens in locoregional metastases and clinical course of the disease in patients with melanoma. *Cancer Res* 1988;48:1019-1025.

van Gool SW, Vanderberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev* 1996;153:47-83.

Velde AA te, Figdor CG. Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. *Mel Res* 1991;1:303-309.

Vollmer RT. Malignant melanoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *Pathol Annu* 1989;24:383-407.

von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC. Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:1287-1294.

Vossaert KA, Silverman MK, Kopf AW y cols. Influence of gender on survival in patients with stage I malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:429-440.

Wagner DH, Stout RD, Suttles J. Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur J Immunol* 1994;24:3148-3154

Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C y cols. Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest* 1998;78:541-550.

Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001;14:105-110.

Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996;183:2541-2550.

- Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol* 2001;22:269-276.
- Webb DS, Mostowski HS, Gerrard TL. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol* 1991;146:3682-3686.
- Weinstock MA, Boyle MM. Statistics of interest to the dermatologists. En: Thiers B, Lang PG Jr. (eds). *Year book of Dermatology and Dermatologic Surgery*. Mosby: St. Louis, 1998, pp 7-23.
- Westendorp RPJ, Langermans JAM, Huiziga TWG, Elouali AH, Verweij CL, Vandenbroucke JP. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:170-173.
- Whiteman DC, Valery P, McWhirter W, Green AC. Risk factors for childhood melanoma in Queensland, Australia. *Int J Cancer* 1997;70:26-31.
- Woods JE, Taylor WF, Pritchard DJ y cols. Is the BANS concept for malignant melanoma valid?. *Ann J Surg* 1985;150:452-455.
- Yu X, Fournier S, Allison JP, Sharpe AH, Hodes RJ. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. *J Immunol* 2000;164:3543-3553.
- Yue FY, Dummer R, Geertsen R y cols. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997;71:630-637.
- Zanetti R, Franceschi S, Rosso S y cols. Cutaneous melanoma and sunburns in childhood in a southern European population. *Eur J Cancer* 1992;28A:1172-1176.
- Zhang XG, Klein B, Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 1989;74:11-13.
- Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F y cols. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through and NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 1996;184:579-584.
- Zheng C, Huang DR, Bergenbrant S y cols. Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2000;109:39-45.
- Zhou D, Munster A, Winchurch RA. Pathologic concentrations of interleukin 6 inhibit T cell responses via induction of activation of TGF- β . *FASEB J* 1991;5:2582-2585.
- Zierhut M, Bieber T, Bröcker EB, Forrester JV, Foster CS, Streilein JW. Immunology of the skin and the eye. *Immunol. Today* 1996;17:448-450.