

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS
DE HISTOCOMPATIBILIDAD
EN MELANOMAS MALIGNOS CUTANEOS

Tesis presentada por Doña M^{re} ELENA GARCIA LORA para
optar al Grado de Doctor en Medicina por la Universidad
de Granada.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 89 a 19 90

Folio 66

Número 132

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. M^e Clara
Jara Lara, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente
tema, que libremente había elegido: "Estudio de la expresión de anticígenos
de histocompatibilidad en melanomas melánicos cutáneos"

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este
le calificó de APTO CUM LAUDE, POR UNANIMIDAD.

Granada 4 de NOVIEMBRE de 19 89

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: Pamiro Camacho

Fdo.: ROSA M^e CRUEGA de D^o D^o

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

Fdo.: J. ANTONIO CACHAZA

Fdo.: V. Delgado Florencio

Fdo.: José Pachón

FIRMA DEL GRADUANDO.

Dpto de Medicina y Cirugía

A Nerea y a mis padres.

Quiero expresar mi agradecimiento:

A los directores de este trabajo. Sin sus orientaciones, ánimos y correcciones, no hubiese sido posible la realización del mismo.

Al Dr. Lopez Nevot, por su colaboración en los trabajos de laboratorio y ayuda continuada.

A la Profesora Ortega del Olmo y Srta. Maria Jesús Moreno, de la Unidad de Melanomas del Servicio de Dermatología, al Profesor Aneiros, del Servicio de Anatomía Patológica y al Profesor Saucedo, del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de Granada.

Al Dr. Ruiz Cabello, a la Dra. Oliva y al Dr. Martin del Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital General de Especialidades Virgen de la Nieves.

A todos los compañeros de los Servicios de Dermatología del Hospital Universitario de Granada y de Análisis Clínicos del Hospital General de Especialidades Virgen de la Nieves.

Por último, a todos los que directa o indirectamente hicieron posible mi trabajo.

INDICE

INTRODUCCION

	1.
I-1 MELANOMAS.	2.
I-1.1 ASPECTOS HISTORICOS.	2.
I-1.2 EPIDEMIOLOGIA	7.
I-1.2-1 Incidencia.	7.
I-1.2-2 Factores que influyen en la incidencia.	7.
I-1.3 CLINICA.	18.
I-1.3-1 Clasificación Clínica.	18.
I-1.3-2 Clasificación Evolutiva.	21.
I-1.3-3 Formas Clínicas de acuerdo con su clasificación.	31.
I-1.3-4 Otras Formas Clínico- evolutivas.	32.
I-1.4 PATOLOGIA.	35.
I-1.4-1 Clasificación Patológica.	39.
I-1.4-2 Melanomas con Patrones Especiales o Atípicos.	42.
I-1.4-3 Melanomas primarios Múltiples.	47.
I-1.4-4 Melanomas sobre Nevus Congénitos.	48.
I-1.4-5 Regresión Espontánea del Melanoma Maligno.	49.

I-1.5 PRONOSTICO.	53.
I-1.5-1 Factores Clínicos.	53.
I-1.5-2 Factores de Histopronóstico.	56.
I-1.6 DIAGNOSTICO.	65.
I-1.6-1 Tumores Pigmentados.	66.
I-1.6-2 Tumores Amelanóticos.	66.
I-1.7 INMUNOLOGIA.	67.
I-1.7-1 Antígenos de Melanoma.	69.
I-1.7-2 Competencia Inmunológica de los Pacientes de Melanoma.	72.
I-1.8 TRATAMIENTO.	79.
I-1.8-1 Tratamiento Quirúrgico.	79.
I-1.8-2 Quimioterapia.	82.
I-1.8-3 Radioterapia.	84.
I-1.8-4 Inmunoterapia.	86.
I-2 ANTIGENOS HLA.	93.
I-2.1 BASES GENÉTICAS DEL SISTEMA HLA.	95.
I-2.2 ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS HLA.	100.
I-2.2-1 Antígenos HLA de Clase I.	101.
I-2.2-2 Antígenos HLA de Clase II.	106.
I-2.3 ESTRUCTURA DE LOS GENES HLA.	112.
I-2.3-1 Genes HLA de Clase I.	112.
I-2.3-2 Genes HLA de Clase II.	116.

I-2.4	APLICACIONES DE LA TECNICA DE SOUTHERN BLOT AL ESTUDIO DE LOS GENES HLA.	122.
I-2.5	DISTRIBUCION TISULAR DE LOS ANTIGENOS HLA.	126.
I-2.5-1	Antígenos HLA de Clase I.	126.
I-2.5-2	Antígenos HLA de Clase II.	127.
I-2.6	FUNCION DE LOS ANTIGENOS HLA.	128.
I-2.6-1	Fenómeno de Restricción del CMH sobre la respuesta Inmune.	128.
I-2.6-2	Aloreactividad.	137.
I-2.6-3	Significado Biológico del Polimorfismo de los anti- genos del CMH,	138.
I-2.7	IMPORTANCIA DE LOS GENES QUE CODI- FICAN PARA LOS ANTIGENOS DEL CMH EN LA EVOLUCION DE LOS TUMORES.	139.
I-2.7-1	Tipos de Genes que condicio- nan el Origen y Desarrollo de Neoplasias.	139.
I-2.7-2	Antígenos de Histocompatibi- lidad y Capacidad Metastásica de los tumores.	141.
I-2.7-3	Expresión Anormal de los Productos del CMH en los Tumores.	142.

I-3 ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y MELANOMA MALIGNO.	150.
I-3.1 ANTIGENOS HLA DE CLASE I.	150.
I-3.2 ANTIGENOS HLA DE CLASE II.	153.
<u>OBJETIVOS.</u>	158.
<u>MATERIAL Y METODOS.</u>	160.
II-1 ESTUDIO CLINICO.	163.
II-2 TECNICAS HISTOLOGICAS.	163.
II-2.1 DERMATOLOGIA.	163.
II-2.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA.	166.
II-2.3 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA SOBRE CORTES CRIOSTATICOS.	168.
II-3 TECNICA DE CULTIVO CELULAR.	169.
II-4 CONGELACION Y DESCONGELACION DE CELULAS.	171.
II-5 TRATAMIENTO IN VITRO CON GAMMA- INTERFERON.	172.
II-6 TECNICA DE RADIOUNION.	173.
II-7 TECNICAS INMUNOQUIMICAS.	175.

II-7.1 ACOPLAMIENTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL A GEL DE SEFAROSA ACTIVO. 4B-CNBr.	175.
II-7.2 MARCAJE EXTERNO CON I ¹²⁵	177.
II-7.3 LISADO DE LAS CELULAS MARCADAS.	178.
II-7.4 INMUNOPRECIPITACION.	180.
II-7.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON S.D.S.	180.
II-7.6 PREPARACION DEL GEL PARA LA AUTORADIOGRAFIA.	185.
II-7.7 CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS INMUNOPRECIPITADAS.	187.
II-8 TECNICA DE SOUTHERN BLOT.	188.
II-8.1 PREPARACION DE LA SONDA.	189.
II-8.2 PREPARACION DEL FILTRO PARA LA HIBRIDACION.	205.
II-8.3 HIBRIDACION.	218.
II-9 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.	221.
<u>RESULTADOS</u>	222.
III-1 DESCRIPCION DE LA MUESTRA (ANEXO 1).	223.
A.- Datos obtenidos por la exploración.	223.
B.- Datos obtenidos por la historia clínica.	225.
C.- Factores de histopronóstico.	226.

III-2	EXPRESION DE ANTIGENOS HLA (ANEXO2)	228.
A.-	MM Primitivos.	228.
B.-	MM Metastásicos.	229.
III-3	RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO (ANEXO 3)	229.
A.-	Con las variables obtenidas por la exploración.	229.
B.-	Con las variables obtenidas por la historia clínica.	233.
C.-	Con los factores de histopronóstico.	235.
III-4	ANALISIS DE LA LINEA DE MELANOMA M1.	238.
1.-	Características de la línea M1.	239.
2.-	Estudio Fenotípico.	239.
3.-	Análisis Inmunoquímico.	239.
4.-	Inducción de expresión de moléculas HLA de clase I y II con gamma-Interferon.	239.
5.-	Estudio de los genes de clase I y II.	240.

GRAFICAS Y TABLAS

Anexo 1:	Descripción de la muestra	243.
Anexo 2:	Expresión de antígenos HLA.	264.
Anexo 3:	Relaciones estadísticas entre las variables de estudio.	269.

311.

FOTOS

DISCUSION.

336.

CONCLUSIONES.

351.

BIBLIOGRAFIA.

354.

HIPOTESIS DE TRABAJO

El MM es un tumor frecuente, con unos criterios de pronóstico, clínicos e histológicos, que nos orientan sobre su evolución.

Las evidencias de la participación de la respuesta inmune en el desarrollo de la enfermedad son conocidas pudiendo ocasionar regresión parcial o total del tumor y/o sus metástasis.

Para que se produzca una respuesta útil del huésped frente al tumor, es necesaria una adecuada presentación de los antígenos tumorales y una eficaz respuesta citotóxica. Esta respuesta no se produce si la expresión de moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad es inadecuada.

Si modificaciones, cuantitativas y cualitativas, de la expresión HLA en células de MM pueden modificar la evolución de la enfermedad y ésta está de acuerdo con unos criterios de pronóstico, debe existir algún tipo de relación entre una y otros.

Nos proponemos conocer en qué medida existe una correlación entre la expresión de antígenos HLA de Clase I y Clase II en las células de MM primitivo y MM metastásico y los demás criterios tumorales de pronóstico.

Comprobadas las alteraciones fenotípicas en las células de MM primitivo y metastásico, nos

proponemos ver si estas modificaciones se deben a una alteración genética propia o a otros mecanismos, y comprobar si la adicción de linfokinas a las células MM, puede modificar la expresión de HLA.

INTRODUCCION

I-1 MELANOMAS

I-1.1 ASPECTOS HISTORICOS

La primera descripción de Melanoma Maligno (MM), fué publicada por John Hunter en 1.787 (Davis, McLeod , 1.985). La pieza estudiada por Hunter se conserva en el Hunterian Museum of the Royal College of Surgeons of England, con el número 219. Procedía de un hombre de 35 años, con tumor recidivado en ángulo mandibular. Después de extirpar el tumor, Hunter describió "que una parte era blanca y otra de aspecto esponjoso, blanda y negra", la etiquetó como una "excrecencia cancerosa fungosa". En 1.968 Eodenhan, confirmó con exámen microscópico que el tumor era un MM, presumiblemente, una metástasis secundaria de un tumor primario desconocido.

Laennec fué el primero en describir el MM como entidad patológica, en una memoria presentada en la Facultad de Medicina de París. Breschet y Penberton consideran que fué Dupuytren el primero en descri-

birlo. Laennec utilizó por primera vez la palabra "Melanosis" en un trabajo publicado en el Bulletin de la Faculté de Medecine de Paris en 1.812. (Laennec, R.TH. 1.812).

En 1.820, Willian Norris describió el primer caso de MM registrado en la literatura inglesa, como "Caso de enfermedad fungoide". Empleó varios principios clínicos y epidemiológicos del MM en un trabajo publicado en 1.857, titulado "Ocho casos de melanosis con aspectos patológicos y terapeuticos de esta enfermedad". Estos principios conservan plena validez en la actualidad:

*Relación entre lunares y MM.

La enfermedad, era más frecuente en áreas industriales que en áreas rurales.

Los pacientes tenían pelo rubio y una proporcionada complexión.

En algunos casos, historia familiar y probable disposición hereditaria.

La existencia de un trauma puede acelerar el crecimiento del tumor.

Mayor frecuencia en hombres fumadores.

Los pacientes permanecían con buen estado

general, hasta estadios avanzados de la enfermedad.

A diferencia de los tuberculosos, no presentaban fiebre.

El grado de pigmentación, era variable y podían existir MM amelanóticos.

El tumor era, a menudo, nodular y pediculado.

Alrededor del tumor primitivo se pueden desarrollar satelites.

La diseminación podía afectar a pulmones, hígado, hueso, corazón y duramadre.

Después de una excisión mínima de la lesión, se produce recurrencia local.

Se precisa, una extirpación amplia del tumor que incluya tejido sano circundante.

Observó que ningún tipo de tratamiento médico ó quirúrgico era efectivo, cuando la enfermedad se había diseminado.

En este trabajo Norris describe la enfermedad como "Melanosis", término que todavía se emplea, aunque el primero en utilizarlo en la literatura inglesa fué Robert Carswell. (Carswell, R., 1.838).

Williams en 1.834 (Davis , McLeod , 1.985),

describió por vez primera lo que hoy conocemos, como fases horizontal y vertical en el crecimiento de los MM.

En 1.840, Cooper considera como medida terapéutica fundamental, el tratamiento precoz del "cáncer negro". (Cooper, S., 1.840).

En el libro "Lectures on Surgical Pathology" de J. Paget, se presenta una serie de 25 pacientes con MM. (Paget, J., 1.835).

Hutchinson en 1.857, en su artículo "Melanotic Disease of the great toe, following a whitlow of the Nail", describe el primer caso de MM subungueal. En 1.892 y 1.894, Hutchinson describió e ilustró una serie de casos y a partir de entonces se empezó a utilizar el término de "Peca de Hutchinson".

Las bases del tratamiento quirúrgico del MM se establecieron en "The Pathology of Melanotic Growths in Relation to their Operative Treatment", de Handley. Estableció las indicaciones de la extirpación local amplia acompañada de linfadenectomía regional y amputación según los casos. Sus recomendaciones se han seguido hasta nuestros días. (Handley, W.S., 1.907).

En la actualidad, los aspectos clínicos (formas clínicas según patrón de crecimiento (Clark, 1967), formas evolutivas en estadios (Beahrs y cols, 1983), MM familiar (Clark y cols, 1978)), patológicos (niveles de invasión (Mehnert, Heard, 1965)(Clark y cols, 1969), espesor del tumor (Breslow, 1970), lesiones precursoras (Sagebiel, 1979)(Elder y cols, 1980)(Elder y cols, 1981)(McGovern, 1982), ulceración (Balch y cols, 1980)(McGovern y cols, 1982), actividad mitótica (McGovern y cols 1979), reacción linfocítica (McGovern y cols, 1981), tipo celular (McGovern y cols, 1981)), biológicos (determinación de 5-S-cysteinil₁dopa y niveles séricos de IgG₄ (Cesarini y cols, 1978), Ags. HLA (Cavelier y cols, 1980), estudio de Ags. asociados a MM (Curry y cols, 1981)(Hellström y cols, 1981), respuesta humoral de los pacientes de MM frente al tumor (Ferrone, Pellegrino, 1977)) y terapéuticos, (extirpación con amplio margen (Milton, 1977)(Cascinelli y cols, 1980), disección ganglionar terapéutica (Milton, 1977), disección ganglionar profiláctica (Veronesi y cols, 1980)(Milton y cols, 1982), quimioterapia e inmunoterapia (Veronesi y cols, 1982)) se han tratado de aclarar, aunque por el momento el MM continua siendo una enfermedad de evolución imprevisible (Dulanto, Armijo, 1981).

I-1.2 EPIDEMIOLOGIA

I-1.2.1 INCIDENCIA

Constituyen el 1% de todos los tumores malignos y el 3-5% de los tumores malignos cutaneos (Kopf y cols, 1979). Tanto su incidencia (Tabla I), como su mortalidad (Tabla II) han aumentado en todo el mundo.

Su incidencia anual es de 4,5/100.000 habitantes en la raza blanca y 0,8/100.000 en la negra (Kopf y cols, 1979). La magnitud del aumento del riesgo de mortalidad por MM parece ser similar entre los paises de alto nivel económico y raza blanca. Últimamente se ha observado que este aumento en la mortalidad, vá progresivamente disminuyendo, lo que indica que el diagnóstico precoz está ejerciendo un control eficaz en la evolución del MM.

I-1.2-2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA INCIDENCIA

Aunque el problema es complejo, hay factores

TABLA I: INCIDENCIA MELANOMAS

PAIS	INCIDENCIA (X 10.000)		
	Varones	Mujeres	Total
<u>AUSTRALIA</u>			
Sydney (McCarthy y cols, 1980)	10,1	12,1	22,2
Sydney (McCarthy y cols, 1980)	22,4	24,4	44,8
Queensland (Beardmore, 1972)	--	--	16,5
Queensland (Little y cols, 1980)	--	--	33,1
Queensland (Green, 1982)	--	--	39,7
<u>ESTADOS UNIDOS</u>			
California (Morton y cols, 1985)	14,0	11,0	25,0
Minnesota (Resseguie y cols, 1977)	4,0	3,9	7,9
Boston-New york (Sober y cols, 1979)	--	--	9,0
<u>ITALIA</u>			
Milan (Berrino y cols., 1981)	2,4	5,4	7,8
<u>DINAMARCA</u>			
Odense (Clemmesen, 1977)	4,7	7,0	11,7
Odense (Danish Cancer Registry, 1982)	5,8	8,2	14,0

TABLA I: INCIDENCIA MELANOMAS (cont.)

PAIS	INCIDENCIA (X 10.000)		
	Varones	Mujeres	Total
<u>SUECIA</u>			
Göteborg (Eklund, Malec, 1978)	--	--	2,5
Göteborg (Eklund, Malec, 1978)	--	--	11,6
<u>ESCOCIA</u>			
Glasgow (Mackie, Hunter, 1982)	--	--	4,9
Glasgow (Mackie, Hunter, 1982)	--	--	5,3
Glasgow (Mackie, Hunter, 1982)	--	--	4,7
<u>ALEMANIA</u>			
Erlangen (Wagner, Becker, 1982)	--	--	4,0
<u>CHINA</u>			
Hong-Kong (Crombie, 1979)	0,6	0,3	0,9

TABLA II: MORTALIDAD MELANOMAS

PAIS	MORTALIDAD (X 10.000)		
	Varones	Mujeres	Total
<u>AUSTRALIA</u>			
Sydney (McCarthy y cols, 1980)	4,4	2,7	7,1
Sydney (McCarthy y cols, 1980)	4,8	2,8	7,6
<u>ESTADOS UNIDOS</u>			
Alabama (Mason, Mckay, 1974)	2,2	1,7	3,9
Durham (Reintgen y cols, 1982)	--	--	1,18
Durham (Reintgen y cols, 1982)	--	--	2,29
<u>ITALIA</u>			
Milan (Berrino y cols, 1981)	1,1	1,4	2,5
<u>SUECIA</u>			
Göteborg (Eklund, Malec, 1978)	--	--	1,3
Göteborg (Eklund, Malec, 1978)	--	--	3,1
<u>ALEMANIA</u>			
Erlangen (Wagner, Becker, 1982)	1,62	1,19	2,81
<u>JAPON</u>			
Sendai (Seiji, Ohsumi, 1972)	--	--	0,06
Sendai (Ohsumi, Seiji, 1977)	--	--	0,21

que inciden de forma más o menos decisiva en la aparición del MM:

I-1.2-2.1 Factores ambientales:

*Latitud de residencia. La incidencia de MM entre la población blanca, aumenta directamente conforme su residencia se aproxima al Ecuador (Crombie, 1979) (Lee, 1982)(Lee, 1982). Hay sus excepciones, siempre en relación con las formas de vida. En el norte de Australia no hay mayor incidencia de MM (Holman y cols, 1980), ni de otros tumores cutáneos (Armstrong y cols, 1982)(Carmichael, Silverstone, 1961).

*Patrones migratorios. El riesgo entre los emigrantes está relacionado con la duración de su residencia en un país soleado. En Israel entre judíos inmigrantes, existía menor riesgo en aquellos que llevaban menos tiempo en su nueva residencia.

I-1.2-2.2 Edad

La edad media de aparición del MM, varía entre 45-55 años, en los estudios realizados en las últimas décadas (Balch y cols, 1983). El riesgo de

MM aumenta con la edad (Lee, 1978)(Iee y cols, 1979).

I-1.2-2.3 Sexo

Suele afectar por igual a ambos sexos. Últimamente aumenta la incidencia de MM en el sexo masculino (Houghton y cols, 1980)(Little y cols, 1980)(McGregor y cols, 1983).

I-1.2-2.4 Factores de riesgo

* Pigmentación cutánea. Personas de piel blanca que viven en países soleados, debido a la incapacidad de su piel para protegerlos de la acción del sol (Murray, 1934). Matas en 1896, escribió sobre la baja incidencia de MM en negros americanos. Los individuos de países mediterráneos de piel morena, tienen menor incidencia que los que habitan en el norte de Europa, aunque vivan más cerca del Ecuador (Lee, 1982).

Un estudio realizado en el Duke Medical Center (DMC), comprobó que los pacientes negros afectados de MM tenían una menor supervivencia. Una explicación a esto, sería que los negros tiene una mayor predispo-

sición a desarrollar MM acrales en zonas no pigmentadas (palmas, plantas, uñas)(Reed, 1976)(Crombie, 1979), mientras que las áreas más pigmentadas eran menos susceptibles.

*Color de pelo. Existe un riesgo relativo tres veces superior para pelirrojos y 1,6 veces superior para los rubios (Beral y cols, 1983).

*Color de ojos. No se valora como factor de riesgo (Beral y cols, 1983).

*Historia familiar. El MM puede tener un patrón familiar (Norris, 1820)(Duggleby y cols, 1981).

Los parientes de enfermos de MM presentan un riesgo relativo de 1,7 (Anderson, 1971). Se ha descrito una mayor incidencia de Ag HLA DR4, un alotipo del factor Bf del complemento y una disminución de la actividad NK (Hersey y cols, 1979). Sin embargo los pacientes con MM familiar tienen mejor pronóstico (Turkington, 1965)(Anderson y cols, 1967)(Anderson, 1971).

*Factores genéticos. (Acton y cols, 1983)(Acton

y cols, 1982)(Clark y cols, 1973). Se han considerado como factores de riesgo: grupo sanguíneo O (Jørgensen, Lal, 1972), alotipo Gm2 (Walter y cols, 1979)(Pandey y cols, 1981), Ag HLA DR4 (Barger y cols, 1982), factor properdina B(Pf-S alelo)(Budowle y cols, 1982), con elevada incidencia en pacientes con MM.

*Localización anatómica. Los MM pueden localizarse en toda la superficie cutánea, pero predominan en cabeza y cuello (Elwood, Lee, 1975). Son menos frecuentes en zonas de piel cubiertas, especialmente tronco y región mamaria (Crombie, 1981)(Sober y cols, 1980). las diferencias en la forma de vestir entre hombres y mujeres, condiciona mayor incidencia en distintas localizaciones según el sexo: así mientras en la mujer hay mayor incidencia en extremidades inferiores, en los hombre son más frecuentes en oído externo, localización excepcional en mujeres, debido probablemente al corte de pelo. Los MM del tronco, afectan por igual a ambos sexos (Crombie, 1981). Elwood y Gallagher en 1983, estudiaron la relación entre localización, edad y áreas de piel expuesta con la incidencia de MM. Encontraron menor incidencia en áreas de piel no expuesta.

*Estatus social y factores ocupacionales específicos. Existen pocos estudios que relacionen la incidencia de MM con el tipo de trabajo. Datos obtenidos en Escandinavia (Teppo, 1.980), Gran Bretaña (Lee, 1.980) y Australia (Holman y cols., 1.980), demostraron un alto índice de mortalidad por MM entre los veterinarios (Blair, Hayes, 1.982), y una mayor incidencia en cabeza y cuello en trabajadores al aire libre (Beral, Robinson, 1.981).

La etiología de estos tumores no se relaciona normalmente con el lugar de trabajo. En un estudio realizado, entre los trabajadores de una planta química del Lawrence Livermore National Laboratory (Albert y cols., 1.980), se encontró mayor incidencia de MM ocular, hecho que no ocurría en un laboratorio de similares características, como el Alamos National Laboratory (Acquavella y col., 1.982). No se pudo demostrar un factor externo. Otros estudios relacionan la incidencia de MM con la exposición a la luz fluorescente (Beral y cols., 1.982). Se ha visto que existe una asociación entre el riesgo de padecer MM, y un nivel socio-económico alto (Beral, Robinson, 1.981).

*Lesiones precursoras.

Xeroderma pigmentoso. Existe una alteración en la reaparición del DNA lesionado por la radiación ultravioleta. Por tanto se produce un aumento de incidencia para todos los tumores cutáneos malignos, incluido el MM.

Nevus. Hubo un periodo durante el que la mayoría de los MM, se consideraron originados a partir de nevus con actividad en unión dermo-epidermica (Sober y cols, 1980). La relación precisa nunca ha podido establecerse de forma clara, debido a la destrucción del nevus por el crecimiento del melanoma, y las deficiencias encontradas en las historias clínicas. Recientemente (Sagebiel, 1979) se han estudiado MM pequeños, y en la mitad de los pacientes fué posible reconocer estructuras névicas en los bordes.

En pacientes con historia de MM familiar, se encuentran nevus de mayor tamaño y aspecto peculiar (Reimer y cols, 1978)(Lynch y cols, 1980), estos "nevus displasicos" se encontraron también en pacientes de MM, sin historia familiar (Elder y cols, 1980). No esta claro por tanto, si el diagnóstico y posterior

extirpación de estos nevus, puede contribuir de forma importante al control del MM esporádico.

Los pacientes inmunodeprimidos presentan alto riesgo para desarrollar MM y nevus displásicos (Greene y cols, 1981).

Los pacientes que presentan más de 20 nevus, tienen un riesgo relativo de 3,4 (Beral y col, 1983).

La epidemiología tiene aun algunas áreas por explorar, las relaciones entre la edad y los nevus cutáneos (Nicholls, 1973), la relación entre la piel bronceada y los MM (Beitner y cols, 1981). Persisten muchas incógnitas. Comportamiento inesperado, como los MM que surgen después de vacaciones, los asociados a vitíligo y los que presentan evolución lenta después de varios embarazos, largos intervalos silentes, la menor agresividad del MM en la mujer (Lee, Storer, 1982)(Holly y cols, 1983), y la regresión espontánea en casos de enfermedad avanzada, ponen de manifiesto que los MM, son potencialmente vulnerables a los mecanismos de defensa, todavía poco explorados.

I-1.3 CLINICA

El MM, es un tumor con gran polimorfismo clínico. Suele ser pigmentado, aunque son posibles formas amelanóticas o con gran riqueza cromática. Sus formas clínicas, están perfectamente definidas desde los estudios de Clark (Clark y cols, 1969).

Representa una entidad dinámica, por lo que , según su extensión, se admiten distintas etapas evolutivas, clasificadas según diversos criterios (Goldsmith, 1979)(McNeer, Dasgupta, 1964)(DeVita y cols, 1982)(Smith, 1976)(Ketcham, Christopherson, 1979). La O.M.S. las clasifica de acuerdo con las normas básicas del esquema TNM (Beahrs y cols, 1983).

I-1.3-1 CLASIFICACION CLINICA

Se basa en el comportamiento biológico. Clark y Mihm en 1969 (Clark y cols, 1969), admiten 4 tipos de MM según su crecimiento:

*MELANOMA DE EXTENSION SUPERFICIAL (M.E.S.),
(S.S.M.: SUPERFICIAL SPREADING MELANOMA). Es la forma más frecuente, un 70% (Clark y cols, 1969)(Clark y cols, 1975)(McGovern y cols,1973)(Mihm y cols, 1971)(Mihm y cols, 1975). Aparece con predominio por el sexo femenino en edades tempranas de la vida. Lesión policrómica de contornos geográficos, irregulares bien delimitados con ribete de color rosado, superficie ligeramente elevada en la totalidad ó bien en los bordes, de diametro variable y crecimiento radial. Se localiza preferentemente en extremidades inferiores en la mujer y espalda en el varón (Clark y cols, 1969), su color varía desde el rojo al negro, con distintas escalas de grises. Afecta solo a la epidermis y cuando sobre la superficie aparece un nódulo, indica crecimiento vertical del tumor e invasión de planos cutáneos más profundos. Su evolución es larga, la fase de progresión radial dura desde algunas semanas a 10 años o más, mientras que la fase de progresión vertical es más rápida.

*LENTIGO MALIGNO MELANOMA (LMM). Representa el 4-10% de los MM (Clark y cols, 1969). Aparece en individuos de edad avanzada, entre 60-70 años, con ligero predominio por sexo femenino y localizado

preferentemente en zonas descubiertas: cara y cuello sobre todo (Clark y cols, 1969). Se inicia como una mancha marrón que crece lentamente por los bordes, hasta formar una placa policrómica con diferentes tonos de marrón, de contornos irregulares, superficie plana, a veces queratósica, y tamaño variable. Mientras la superficie es plana, hay crecimiento radial, la aparición de un nódulo indica crecimiento vertical. Su evolución es larga y la fase de crecimiento horizontal puede durar hasta 20 años (McGovern y cols, 1973).

* MELANOMA NODULAR (MN). Representa el 15-30% de los MM (Clark y cols, 1973)(Clark y cols, 1969) (McGovern y cols 1973)(Mihm y cols, 1971)(Mihm y cols, 1975). Suele aparecer en la edad media de la vida, localizándose preferentemente en tronco y extremidades, sin diferencias para ambos sexos. Comienza como una lesión elevada en cúpula, de crecimiento rápido, de 1-2 cm de diametro, coloración uniforme azul-negrizca. Un 5% de los MN pierden pigmento o son amelanóticos. Ocasionalmente pueden ser pediculados (McGovern y cols, 1983)(Manci y cols, 1981). Su evolución es monofásica, de entrada vertical, sin fase horizontal. Son los más agresivos.

*MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL (ALM) (ACRAL LENTIGINOUS MELANOMA). Representa del 2-8% de los MM en la raza blanca (Lopansri, Mihm, 1979) y un 35-60% en la raza negra, oriental y puertorriqueños (Reintgen y cols, 1982)(Seiji, Takahashi, 1982). Suele aparecer en individuos de edad avanzada. Su aspecto clínico varia del LMM al SMM. Localizado en palmas, plantas y región periungueal (Arrington y cols, 1977)(Coleman y cols, 1980)(Krementz y cols, 1982)(Paladugu y cols, 1983)(Sondergaard, Olsen, 1980)(Seiji, Takahasi, 1982). Se inicia como una lesión plana (Coleman y cols, 1980), de coloración marrón azulada no homogénea, superficie finamente escamosa que rara vez se ulcera. Cuando aparecen pequeñas elevaciones indican alto índice de invasión. Su evolución suele ser rápida, oscilando entre varios meses a varios años, con una media de 2,5 años. Es un tumor agresivo y metastatizante.

I-1.3-2 CLASIFICACION EVOLUTIVA

La evolución natural del tumor, incluye en las formas SSM, LMM, ALM, una fase radial más o menos larga y otra vertical de invasión en profundidad, aparición de metastasis cutáneas, ganglionares

y viscerales. En los MN, al carecer de fase radial, la evolución es más corta. Dejados a su evolución natural, acaban con la vida del paciente en un periodo de tiempo variable. Se admiten regresiones espontáneas totales o parciales del tumor primario, persistiendo metástasis, e incluso curaciones espontáneas de la enfermedad (McGovern, 1972)(Smith, Stehlin, 1965).

Para establecer criterios de tratamiento y valorar resultados, es necesario establecer distintas etapas que permitan variar tratamientos en función del grado de invasión del tumor.

Aún no se ha llegado a un acuerdo y no disponemos de una clasificación aceptada y utilizada por los diferentes grupos de trabajo. Por lo que a veces al comparar, no sabemos si se están utilizando tumores con el mismo nivel biológico y es difícil o imposible llegar a conclusiones definitivas, lo que unido a la presencia de variaciones genéticas, fisiológicas e inmunológicas entre los distintos pacientes, hace que todo intento de clasificación evolutiva sea artificial.

Cualquier clasificación en estadios del

MM, debe comprender todas las manifestaciones del tumor primitivo, metastasico o recidivas, y cuantificar las variaciones en la respuesta al tratamiento. Se emplean principalmente:

* "Sistema de 3 estadios". Este sistema fué el primero y más utilizado (Goldsmith, 1979)(McNeer, Dasgupta, 1964).

<u>ETAPA</u>	<u>CRITERIOS</u>
I	Melanoma primario localizado.
IA	Recidiva local (Satélites).
II	Metástasis en nódulos linfáticos regionales o en la zona de la piel subsidiaria.
III	Melanoma diseminado.

Es una clasificación simple y facil de recordar, no incluye criterios tan importantes como el nivel de invasión y el espesor del tumor.

De Vita y cols en 1982, modifican esta clasificación:

1) Local.

- . Solo la lesión primaria.
- . Lesión primaria y satélites en un radio de 5 cm.
- . Recurrencias locales en 5 cm. de radio de la zona resecada.
- . Metástasis localizadas en más de 5 cm. del tumor primitivo, en el área de drenaje linfático regional.

2) Enfermedad a nivel de ganglios linfáticos regionales.

3) Enfermedad diseminada.

Sin embargo, los términos que utilizan tienen diferente significado para el clínico y patólogo. El 85 % ó más de los pacientes diagnosticados de MM, se incluyen en el estadio I, según esta clasificación, por lo que es imposible establecer el riesgo potencial de metástasis.

* "Sistema del M.D. Anderson Hospital".

Es una clasificación menos popular, establece 4 estadios (Smith, 1.976).

ETAPA

CRITERIOS

I	Solo Melanoma primario.
IA	Melanoma primario intacto.
IB	Melanoma primario, extirpado localmente.
IC	Melanomas primarios multiples.
II	Recurrencia local de metástasis, en un área de 3 cm. del tumor primario.
III	Metástasis regionales.
IIIA	Tejidos, excluyendo ganglios linfáticos.
IIIB	Ganglios linfáticos.
IIIAB	Piel, etc., y ganglios linfáticos.
IV	Metástasis a distancia.
IVA	Solo metástasis cutáneas.
IVB	Cualquier metástasis visceral.

Tampoco se incluyen criterios microscópicos, y casi todos los pacientes, se incluyen en estadio I, y solo una pequeña parte en estadio II.

* "Sistema de la Unión Internacional contra el Cáncer" (UICC). En 1.978, la UICC introduce 2

nuevos criterios para establecer los estadios de MM: Nivel de invasión (Clark y cols., 1.975), y Espesor del tumor (Breslow, 1.970).

<u>ETAPA</u>	<u>CRITERIOS</u>
IA	Tumor que invade dermis papilar (niveles II y III), y de 1,50 mm. ó menos de espesor.
IB	Tumor que invade dermis reticular o tejido subcutáneo (niveles IV y V) , y de 1,51 mm. ó más de espesor.
II	Invasión de ganglios linfáticos regionales.
III	Invasión de ganglios linfáticos yuxtaregionales.
IV	Metástasis a distancia.

Esta clasificación utiliza criterios TNM, sin embargo, un gran número de pacientes se agrupan en estadio I, y solo un número muy reducido en estadio III.

* "Sistema del American Joint Committee On Cancer". El comité americano para el cancer, ha

trabajado durante 10 años en desarrollar sistemas uniformes de clasificación para todos los cánceres. En estudios retrospectivos del MM, se indicaron factores que influyen en los resultados del tratamiento. Entre estos factores se incluye: edad, sexo, ulceración, localización, tamaño, y presencia de satélites regionales o metástasis linfáticas; algunos caracteres microscópicos, como diferenciación celular, actividad mitótica, e invasión vascular se han relacionado con la supervivencia.

Propone 4 estadios (Ketchan, Christopherson, 1.979), y utilizan los criterios TNM (Beahrs y cols., 1.983):

Tumor primario (T).

TX: No existe evidencia del tumor primario (tumor primario desconocido o extirpado sin examen histopatológico).

T0: Hiperplasia melanocítica atípica (Nivel I de Clark) no se considera una lesión maligna.

T1: Invasión de dermis papilar (Nivel II) o espesor igual a 0,75 mm. ó menos.

T2: Invasión de la interfase papilar-reticular

de la dermis (Nivel III), ó espesor entre 0,75 mm. y 1,5 mm.

T3: Invasión de dermis reticular (Nivel IV) ó espesor entre 1,5 y 4 mm.

T4: Invasión del tejido subcutáneo (Nivel V) ó 4,1 mm. ó más de espesor, ó satélites a 2 cm. de distancia del MM primario.

El espesor de la lesión, es un parámetro de mayor precisión y reproductibilidad que el nivel de invasión, por tanto en caso de duda siempre es el que decide el estadio.

Afectación Ganglionar (N).

NX: No se ha podido establecer el nivel de afectación linfática.

N0: No hay afectación de los ganglios linfáticos regionales.

N1: Invasión de solo un grupo de ganglios regionales; los ganglios son desplazables y no tienen más de 5 cm. de diámetro, ó no existe afectación de los ganglios regionales, pero deben existir metástasis en trayecto en número inferior a 5 y más de 2 cm. de la lesión primaria.

N2: Se ha de reunir alguna de las características siguientes: 1) Afectación de más de un grupo de ganglios regionales. 2) Los ganglios han de tener más de 5 cm. de diámetro ó no ser desplazables. 3) 5 ó más metástasis en trayecto ó cualquier número de, este tipo de metástasis más allá de 2 cm. del tumor primitivo con afectación de los ganglios linfáticos regionales.

Metástasis a distancia (M).

MX: No se han podido establecer los criterios para detectar las metástasis a distancia.

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Afectación de la piel o del tejido subcutáneo más allá de la zona drenada por los ganglios linfáticos regionales.

M2: Metástasis viscerales (en cualquier localización diferente de la piel o tejido subcutáneo).

Tumor Recurrente (r).

El sistema del Comité Americano para el Cáncer, comprende 4 estadíos, basados en los criterios

TNM:

ETAPACRITERIOS

IA	MM localizado de 0,75 mm. ó menos de espesor, ó nivel II (T1, N0, M0).
IB	MM localizado de 0,75 a 1,5 mm. de espesor ó nivel III (T2, N0, M0).
IIA	MM localizado de 1,5 a 4 mm. de espesor, ó nivel IV (T3, N0, M0).
IIB	MM localizado de más de 4 mm. de espesor, ó nivel V (T4, N0, M0).
III	Metástasis ganglionares limitadas que afectan solo a un grupo de ganglios regionales, ó menos de 5 metástasis en trayecto sin invasión de los ganglios regionales. (Cualquier T, N1, M0).
IV	Metástasis regionales avanzadas (Cualquier T, N2, M0), ó cualquier paciente con metástasis a distancia (Cualquier T, cualquier N, M1 ó M2).

Estos 4 estadios definidos anteriormente, delimitan grupos de pacientes de pronóstico diferente, que se distribuyen de una forma más uniforme que

en clasificaciones anteriores.

I-1.3-3 FORMAS CLINICAS DE ACUERDO CON SU LOCALIZACION

*MM en miembros inferiores, más frecuentes en mujeres.

*MM en cara, cuello y tronco, afecta por igual a ambos sexos.

*MM en región medio-dorsal.

*MM subungueal o Panadizo Melanico de Hutchinson. Representa el 2-3 % de los MM en la raza blanca y su incidencia es mucho menor en la raza negra (Feibleman y cols., 1.980) (Pack, Oropeza, 1.967) (Paladugu y cols., 1983) (Papachristou, Fortner, 1.982) (Patterson, Helwing, 1.980). Aparece preferentemente en individuos de ambos sexos con edad avanzada, se localiza sobre todo en el dedo pulgar. Comienza como una mancha marrón, subungueal, a nivel de la matriz y el resto de la uña toma una coloración marrón azulada rodeada de un eritema matricial, se origina una estría pigmentada. Un 10-15 % son amelanóticos. Su evolución es larga, de 18 meses a 5 años, y Papachristou y Fortner, en 1.982, identifican 4 factores que influyen desfavo-

rablemente en el pronóstico:

- Destrucción de la uña.
- MM subungueal en los dedos de los pies.
- Invasión del hueso subyacente.
- Pérdida de pigmentación.

* MM de las Mucosas. (Mihm y cols., 1.975).

Supone un 2 % del total de MM, y afecta predominantemente a negros y orientales. Evoluciona como el SSM, pero es de peor pronóstico que los MM cutáneos.

I-1.3-4 OTRAS FORMAS CLINICO-EVOLUTIVAS.

Algunos aspectos clínicos y el comportamiento biológico del tumor, hace difícil cualquier clasificación rígida, por lo que veremos algunos aspectos, que ciertos autores reconocen como fundamentales a la hora de establecer la clasificación.

*MM y Embarazo.

El embarazo puede modificar el curso evolutivo de un tumor pigmentado, precisamente por la presencia de

receptores citosólicos frente a estrógenos y progesterona (Mowszowicz y cols., 1.982) (Creagan y cols., 1.980) (Grill y cols., 1.982) (McCarthy y cols., 1.980) (Neifeld, Lippman, 1.980) (Thompson y cols., 1.981) (Ellis y cols., 1.985). Se debe desaconsejar un embarazo después de la intervención de un MM primitivo, y el empleo de contraceptivos hormonales.

*MM Familiar o B.K. Mole Syndrome.

Representa un 1-6 % de MM (Anderson, 1.971), la afección es denominada "B.K. mole syndrome" por Clark, en 1.978. Parece ser que se transmite de forma autosómica dominante, y los parientes presentan un riesgo de 1,7 (Anderson, 1.971) En estos pacientes se ha descrito una mayor incidencia de un fenotipo HLA concretamente el DR4, y un alotipo del factor Bf del complemento. La alteración más frecuente desde el punto de vista inmunológico, es una disminución de la actividad MK (Hersey y cols., 1.979). Este síndrome tiene unas características particulares (Turkington, 1.965) (Anderson y cols., 1.967) (Anderson, 1.971).

- La edad significativamente más joven de los pacientes.
- Una frecuencia particular de MM primitivos múltiples.
- Mejor pronóstico vital.

Aparecen tumores pigmentados en número variable, desde 10 a más de 100, con tamaño alrededor de 10 mm. de diámetro, contornos irregulares, policrómicos, superficie lisa o hiperqueratósica, que parecen planos a la inspección, pero la palpación pone frecuentemente en evidencia un componente dérmico, y se localizan sobre todo en tronco y miembros superiores, aunque también cara, cuello, miembros inferiores y zonas no expuestas a los rayos ultravioletas. Su naturaleza no está clara.

La posibilidad de MM en pacientes con B.K., se demuestra con el estudio genealógico de familias (Clark y cols., 1.978). Los nevus que degeneran, son voluminosos, irregulares y polícromos, y se pueden considerar como precursores de MM (Reimer y cols., 1.978).

Otros casos familiares, podrían explicarse

por la acción de agentes carcinógenos sobre miembros de la misma familia, sometidos a idénticas condiciones ecológicas (Cesarini, 1.981).

I-1.4 PATOLOGIA.

De antiguo se conoce, que la proliferación de melanocitos en la juntura dermo-epidérmica "actividad juntural", es un signo de sospecha de malignidad. Jaeger, en 1.956, decía "cuanto más intensa es la actividad juntural, más sospechosa de malignidad es la imagen". Lesiones pigmentadas con estas características se han denominado: Hiperplasia melanocítica atípica (Sagebiel, 1.979), Nevus juntural activo (Traub, 1.951), Nevus displásico (Elder y cols., 1.980), Melanoma in situ (McGovern, 1.982).

En 1.981, Elder observó que en algunos SSM, había un componente periférico de nevus displásico. Para McGovern, en 1.982, la frecuencia de nevus displásico en la periferia de MM es del 39 %, mientras que la de melanoma in situ como componenete adyacente fué del 61 %. El MM aparecería, por transformación maligna de un nevus displásico, o por transformación

maligna directa de los melanocitos, sin nevus preexistente (Melanoma in situ).

NEVUS DISPLASICO. Nevus atípico que por sus caracteres clínico-histológicos, presentan alto riesgo de MM. Morfológicamente, son lesiones intermedias entre los nevus y los SSM. Su tamaño varía entre 5-15 mm. de diámetro, forma redondeada u ovalada, superficie plana raramente tuberosa, bordes irregulares, con frecuencia polícromos, con distintos tonos de grises, negros y rojos. Se encuentran en número variable de 10 o menos a más de 100 (Clark y cols., 1.978). Se localizan principalmente en tronco, cara, miembros superiores y zonas cubiertas. Aparecen en la infancia, y en la adolescencia aumentan en número y tamaño (Tucker y cols., 1.983).

Hay dos criterios citológicos, indispensables para el diagnóstico, comunes a todos los nevus displásicos (Elder y cols., 1.982) (Reed y cols., 1.981):

- Irregularidad e hiper cromatismo nuclear en juntura dermo-epidérmica.
- Infiltrado linfocitario en dermis superficial.

Otros caracteres son comunes a los nevos displásicos: fibrosis de la dermis papilar, neovascularización, y presencia inconstante de un nevus dérmico (Rhoëes y cols., 1.983).

Se distinguen dos tipos arquitecturales en los nevos displásicos (Elder y cols., 1.981):

1) Displasia melanocítica lentiginosa. La más frecuente, se caracteriza por hiperplasia y alargamiento de las crestas epidérmicas, proliferación juntural de melanocitos atípicos que sustituyen a los queratinocitos. Las células se disponen irregularmente, aisladas o en masas. Su citoplasma aparece claro y vacío por retracción del mismo alrededor del núcleo. En dermis superficial, fibrosis; los haces de colágeno se condensan alrededor de la cima de las crestas epidérmicas.

2) Displasia melanocítica a células epitelio-
des. Menos frecuente, se caracteriza por la presencia de teclas, que tienden a confluir y a extenderse lateralmente con orientación horizontal, paralela a las crestas epidérmicas. Las células que constituyen estas teclas, son voluminosas de citoplasma eosinófilo, finamente espolvoreado de pigmento melánico. El núcleo

puede tener nucleolos, pero las mitosis son raras. En dermis infiltrado linfocitario, fibrosis, capilares congestivos y melanófagos.

Hay que diferenciar los nevos displásicos de:

Nevus juntural. Lesión de pequeño tamaño, plana, redondeada u oval, de límites netos y color homogéneo. Histológicamente, las células névicas no atípicas, están agrupadas en tecas a nivel de la juntura dermo-epidérmica (Civatte, 1.982). Estas tecas pigmentadas o no, bien limitadas, de tamaño regular, penetran más o menos en epidermis. La dermis no presenta infiltrado inflamatorio.

Nevus juntural activo. Los criterios de actividad comportan: tecas melanocitárias junturales mal limitadas, constituidas de células finamente pigmentadas, de núcleo irregular, una hiperplasia melanocitaria juntural se establece lateralmente, un infiltrado dérmico mononucleado rico en melanófagos, más raramente puede haber mitosis y migración intraepidérmica de melanocitos, ausencia de maduración de células névicas en dermis profunda.

Los MM que surgen en relación con nevus displásicos, son en general SSM, y muestran antecedentes de nevus en epidermis adyacente.

I-1.4-1 CLASIFICACION PATOLOGICA

De acuerdo con criterios biológicos (Clark, 1.967) (McGovern y cols., 1.973) un amplio grupo de patólogos, en 1.982, admiten:

* Melanoma sin componente adyacente: Melanoma Nodular (MN). Posee un solo componente evolutivo vertical; la extensión horizontal no excede de tres crestas epidérmicas (McGovern y cols., 1.973). Los melanocitos malignos son polimórfos, con gran actividad mitótica, delimitados por un infiltrado mononuclear variable.

* Melanoma con componente adyacente del tipo de melanoma de extensión superficial (SSM). Histológicamente, la fase de crecimiento radial se presenta bajo la forma de una colonización pagetoide de las capas altas del cuerpo mucoso de Malpigio por melanocitos aislados o agrupados en tecas. Las células tumorales son de gran tamaño, monomorfas, con citoplasma grande.

La extensión lateral es superior a 3 crestas epidérmicas (McGovern y cols., 1.973). La invasión vertical se hace por células tumorales aisladas o agrupadas en tecas. En el límite inferior del tumor infiltrado linfocitario.

En 1.975, Clark y cols. utilizaron el término de "fase de crecimiento radial", para el componente de extensión superficial, y la "fase de crecimiento vertical", para la invasión en profundidad.

* Melanoma con componente adyacente del tipo lentigo maligno melanoma (LMM). Término que se utiliza, para designar la lesión descrita por Hutchinson, en 1.892, como "peca senil", hoy conocida como "peca melanica de Hutchinson" (HMF). El componente horizontal asocia una atrofia epidérmica, una migración epidérmica lateral de melanocitos malignos polimorfos, con índice de mitótico débil. La invasión vertical se hace por melanocitos malignos normalmente fusiformes, cargados de pigmento, con incontinencia pigmentaria, y un infiltrado linfocitario peritumoral. Existe una elastosis solar severa.

* Melanoma con componente adyacente del

tipo lentiginoso acral (ALM). Histológicamente, la evolución es bifásica: la fase de extensión radial, asocia una elongación de las crestas interpapilares, con hiperacantosis, proliferación lentiginosa de melanocitos atípicos polimorfos, de gran tamaño, cargados de pigmento, y un infiltrado denso peritumoral; la fase de invasión vertical de la dermis por melanocitos atípicos, agrupados en fascículos, se produce después y se acompaña de una reacción desmoplástica.

* Melanoma con componente adyacente del tipo lentigo mucoso. La histología es parecida a la del Lentigo maligno melanoma, o al Melanoma lentiginoso acral (Dufourmentel y cols., 1.979) (Kopf y cols., 1.979) (Kremer y cols., 1.978).

* Melanomas inclasificables.

- Melanoma Borderline. Ciertas lesiones pigmentadas, presentan histológicamente una invasión dérmica profunda, por melanocitos atípicos. No existe maduración de los elementos celulares hacia la profundidad, y el índice mitótico es elevado. Las anomalías citológicas, son insuficientes para hablar de MM; sin embargo, la ausencia de maduración de los elementos celulares en profundidad, el índice mitótico elevado,

y las anomalías nucleares, son incompatibles con una proliferación perfectamente benigna (Sober y cols., 1.980).

I-1.4-2 MELANOMAS CON PATRONES ESPECIALES
O ATÍPICOS.

* Melanoma Desmoplástico. Puede aparecer en cualquiera de los tipos descritos anteriormente, sobre todo en LMM, ALM y en recidivas locales (Conley y cols., 1.971) (McGovern, 1.982). Se caracteriza por un estroma reactivo celular y fibroso. El estroma puede tener una estructura, que recuerda al Histiocitoma fibroso o puede ser inespecífica; con microscópio electrónico se demuestra una reacción fibroblástica inespecífica, componente histiocítico-fibroso en otros casos, y a veces la apariencia de un Shwanoma. La reacción desmoplástica puede afectar a total o parte del tumor, las células neoplásicas aparecen en pequeños grupos entre los haces de colágeno. Este tipo de MM suele ser recurrente, y su pronóstico malo (Conley y cols., 1.971).

* Melanoma Amelanótico o Hipomelanótico. Su incidencia es de 1,7 a 8,1 % (Giuliano y cols., 1.982).

Es necesario exámen cuidadoso de la pieza histológica, para llegar a un diagnóstico de MM amelanótico. El diagnóstico, en casos de duda, se realiza con microscopía electrónica, que pone en evidencia premelanosomas o melanosomas, o mediante técnicas especiales (Milne, 1.972) (Gaynor y cols., 1.980) (Gaynor y cols., 1.981) (Cochran y cols., 1.982). En ocasiones se desarrollan metástasis amelanóticas, a partir de MM pigmentados primitivos (Guiuliano y cols., 1.982).

* Nevus Azul y MM. Se pueden presentar 3 situaciones:

- El MM puede derivar de los melanocitos de la epidermis situada sobre un nevus azul. Se formaría así un "nevus combinado", que estaría constituido por un nevus azul y un nevus nevocítico (Cochran, 1.983)

- Transformación maligna de un nevus azul. Situación muy rara, de la que solo se han descrito 17 casos (Rubinstein y cols., 1.985)

Rodríguez y Ackerman, en 1.968, afirmaban que algunos nevus azules celulares producen metástasis

ganglionares. Puede que no sean verdaderas metástasis, sino hamartomas melanocitarios en ganglios; los melanocitos en su emigrar desde la cresta neural a la epidermis, podían anormalmente colonizar algún ganglio (Allen, 1949)(McGovern, 1982).

-A pesar de todo, en ocasiones diferenciar un nevus azul de un MM con gran cantidad de pigmento y desmoplástico, o de una metástasis en regresión parcial, es problemático. Cuando un paciente refiere tener una lesión de reciente aparición, que va creciendo y que es azul, o que muestra una mezcla de azul y marrón, existe una sospecha real de que el tumor sea maligno. La eliminación del pigmento antes de realizar la tinción de hematoxilina-eosina, facilita la evaluación de la citología tumoral. La relación con las fibras de colágeno, es interesante, el nevus azul no las afecta y el MM las distorsiona e infiltra.

* Melanoma maligno con aspecto de Nevus de Spitz Con cierta frecuencia las células de melanoma aparecen alargadas, con límites poco definidos, núcleo redondeado y nucleolo prominente, igual que el Nevus de Spitz. Para diferenciarlos nos puede ayudar, la presencia en el MM de células atípicas en epidermis

adyacente, ausentes en el Nevus de Spitz. En el MM hay tecas junturales bajo la epidermis, en continuidad con el resto del tumor, mientras que en el Nevus de Spitz hay un patrón más difuso, con haces que descienden desde las crestas interpapilares. Aunque las células del Nevus de Spitz son grandes, el porcentaje y grado de pleomorfismo es bastante pequeño, y las mitosis son poco frecuentes en contraste con el MM. De todas formas, a veces diferenciarlos es un problema.

En ocasiones, la diferenciación entre nevocitos y células pequeñas de MM, es difícil. Los primeros son más pequeños y con escaso citoplasma, sólo los más cercanos a la epidermis contienen melanina, su núcleo es oval o poligonal muy basófilo, sin nucleolo y si los tiene, son de pequeño tamaño y basófilos. Las mitosis y el pleomorfismo, son raros, aunque pueden aparecer células más grandes sobre todo en superficie. Se disponen ordenadamente en las áreas subepidérmicas, y a menudo dispersos en pequeños acumulos delimitados por tejido fibroso. Las células de MM, forman masas densas y sólo se encuentran aisladas, cuando hay desmoplásia, regresión o inmediatamente después de la fase de crecimiento radial; no suele

haber fibrosis pericelular, y es muy frecuente el infiltrado perilesional.

Las anomalías melanocíticas en la epidermis adyacente y dermis en el SSM, LMN, ALM, y melonoma lentiginoso mucoso, son características y nos ayudan al diagnóstico.

Cuando las células névicas están en dermis profunda o hipodermis, sufren el proceso de "neurotización" o "maduración", se alargan, pierden dopa-oxidasa y melanina, presentan colinesterasa y proteína S-100 (Cochran y cols, 1982)(Reed y cols, 1975). Este tipo de transformación no suele observarse en melanomas (Ainsworth y cols, 1979).

Algunos melanomas, en su porción más profunda, pueden presentar una morfología muy parecida a las células névicas. Esta situación, cuando se produce la diferenciación es imposible, salvo que existan mitosis. En ocasiones, la situación se complica cuando la diferenciación névica afecta a todo el tumor; por lo que es necesaria la búsqueda cuidadosa de mitosis atípicas o de pleomorfismo celular que junto a la presencia de infiltrado inflamatorio, puede

orientar hacia el diagnóstico de MM.

I-1.4-3 MELANOMAS PRIMARIOS MULTIPLES

Desde los estudios genéticos de Anderson en 1971, se demostró la base hereditaria de MM en algunas familias. Después se comprobó que parientes directos de hombres con MM, tenían mayor riesgo de padecer este tumor, que los parientes de mujeres con MM (Wallace y cols., 1971).

En estos pacientes con MM hereditarios, tienen unas lesiones precursoras distintas (Clark y cols., 1978): Nevus B.K.. Estos precursores pueden aparecer aislados o ser múltiples, y tienen tendencia a agruparse, por lo que es frecuente encontrar tumores múltiples de forma simultanea o secuencial.

Suelen aparecer antes que los MM no familiares.

Los MM múltiples, pueden aparecer en personas sin antecedentes familiares, pero sin embargo presentan unos nevus displásicos similares a aquellos que aparecen en los miembros del grupo de MM familiar (Elder y cols.,

1980)(Elder y cols, 1981).

I-1.4-4 MELANOMA SOBRE UN NEVUS CONGENITO

Kopf y cols. en 1979, clasificaron los nevus congenitos según su diametro en:

* Nevus congénitos pequeños de 1,4 cm. o menos de diámetro.

* Nevus congénitos medianos de 1,5 cm.-19,9 cm. de diámetro.

* Nevus congénitos gigantes de 20 cm. o más de diámetro.

A veces los nevus congénitos gigantes tienen satélites, y numerosos nevus congénitos de diferentes tamaños, exparcidos por el tegumento. Mientras estos son grandes y pilosos, los nevus congénitos de mediano tamaño suelen tener una superficie irregular.

El desarrollo de MM sobre nevus congénitos pequeños y medianos es raro (McGovern, Murad, 1985). En nevus gigantes son más frecuentes (2-31%)(McGovern Murad, 1985). Aunque se han encontrado MM sobre

nevus congénitos al nacer, la mayoría aparecen alrededor de los 20 años (Reed y cols, 1965).

Kaplan en 1974, recomienda biopsia como guía del tratamiento; cuando se observa proliferación juntural o nevus azul, existe posibilidad de que aparezca MM.

I-1.4-5 REGRESION ESPONTANEA DEL MM

En algunos MM primitivos, puede producirse regresión espontánea (McGovern, 1972)(Smith, Stehlin, 1965)(McGovern, 1982). Hay un proceso inflamatorio con denso infiltrado de linfocitos entre las células melánicas, que degeneran y se desintegran. El pigmento liberado, lo fagocitan los melanófagos, con aumento de la fibrosis.

La regresión puede afectar a todo el melanoma o solo a una parte, pudiéndose detener en cualquier momento, ocasionando un foco de células melánicas rodeado de fibrosis. Es posible que la regresión parcial este causada por un fenómeno inmunológico sobre un determinado clon celular, ya que el MM con frecuencia es multiclonal, con un comportamiento

inmunológico distinto (Ferrone y cols, 1983).

La imagen histológica de la regresión espontánea, la describieron Smith y Stelin en 1965, en el M.D. Anderson Hospital, con una incidencia de regresión completa del 8,3%. Cuando la regresión es total, el tumor se puede manifestar por sus metástasis, como en la serie de Sydney que comprendía el 7% de 613 pacientes (McGovern, 1966).

La regresión parcial se da con más frecuencia en varones que en mujeres, y más en los MM de poco espesor. En más del 50% de los tumores con más de 0,7 mm, de espesor, se encuentran focos de regresión (McGovern, 1982). La incidencia de regresión espontánea, es mayor del 10% en la serie de la UAB (University of Alabama in Birmingham)(Balch y cols, 1978), y en otras estadísticas (Gromet y cols, 1978)(McGovern y cols, 1979).

La regresión espontánea, plantea una serie de problemas:

- Metástasis de MM, sin tumor primitivo.
Cuando esto ocurre, se supone que el tumor primario

regresó completamente después de producir las metástasis, o bien se trataría de un tumor oculto. Si la metástasis es linfática, hay que buscar en el área de piel drenada por el ganglio linfático; a veces se encuentra una pequeña cicatriz, pigmentada o no, que debe ser extirpada.

- Melanoma con halo depigmentado. En el melanoma de extensión superficial, la regresión puede afectar sólo al componente radial, simulando el Halo Nevus, pero el nódulo central, y la asimetría, nos inclinan a favor del MM.

- Presencia de satélites. La regresión puede dividir al melanoma de extensión superficial, en varios islotes con uno o más nódulos que parecen satélites.

- Aparición de un nódulo inflamatorio. En melanomas nodulares, si la pigmentación es escasa, tienen apariencia de nódulo inflamatorio, con denso infiltrado linfocitario, melanófagos, vasos prominentes, y fibrosis que simula una regresión. Un examen cuidadoso, muestra que el infiltrado es perivascular, la fibrosis aparece alrededor de las crestas papilares

y los melanocitos proliferantes en la región juntural no están degenerados (McGovern, Murad, 1.985).

Cuando la regresión es activa, no hay dificultad en la interpretación, pero cuando ya ha finalizado, la lesión puede parecer una metástasis. En este caso el diagnóstico, se basa en que el colágeno normal de la dermis papilar ha sido reemplazado por una fibrosis orientada en sentido horizontal. Las células que sobreviven al fenómeno de la regresión pueden proliferar, formar un nódulo en la dermis, que puede confundirse con una metástasis, pero el patrón de fibrosis lleva al diagnóstico correcto.

- Regresión en lesiones con poco espesor. Los MM de poco espesor, con regresión parcial, tienen peor pronóstico que los que no presentan regresión (Gromet y cols., 1.978) (McGovern y cols., 1.983). Sin embargo, cuando se hace un seguimiento de 10 años, la regresión no modifica el pronóstico (Balch y cols., 1.985).

I-1.5 PRONOSTICO

En el MM hay unos factores pronósticos, de gran utilidad para valorar los resultados de nuevos tratamientos y las expectativas de vida.

De los resultados de un estudio realizado entre 1.955-1.980 (Balch y cols., 1.985), con 4.000 pacientes afectados de distintas formas de MM en todos los estadios evolutivos, se consideran como factores de pronóstico:

I-1.5-1 FACTORES CLINICOS

I-1.5-1.1 Sexo. En general, se admite que las mujeres tienen mayor índice de supervivencia que los hombres, cuando el MM se encuentra en estadio I (Balch y cols., 1.978) (Balch y cols., 1.985) (Cascinelli y cols., 1.980) (Drzewiecki, Andersen, 1.982) (Schmoeckel y cols., 1.983) (Shaw y cols., 1.980) (Shaw y cols., 1.980). En estadios II y III, las curvas de supervivencia se superponen.

I-1.5-1.2 Localización. Un 46 % de todos los MM, se localizaron en extremidades, y el 52 %

en tronco, cabeza y cuello (Balch y cols., 1.985). Los localizados en extremidades tenían mayor supervivencia, sobre todo los de extremidades superiores; los localizados en manos y pies son de peor pronóstico (Day y cols., 1.981). Los del tronco tienen gran predilección para producir metástasis. Los localizados en cuello cabelludo son de peor pronóstico que los de cara y cuello, con independencia del sexo y espesor del tumor (Urist y cols., 1.985).

I-1.5-1.3 Edad. El promedio de edad en que se diagnosticó el MM, fué de 45 años. En edades avanzadas, se encontró menor supervivencia y más espesor de los tumores. El espesor medio en individuos en la tercera década de la vida fué de 1,1 mm., mientras que en la quinta y séptima de 1,5 mm. y 2,8 mm. respectivamente (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-1.4 Duración de la remisión. El porcentaje de supervivencia, es el mismo para los pacientes que desarrollan metástasis ganglionares clínicamente detectables entre 1-12 meses, y los que las presentan entre 13-24 meses, después del diagnóstico inicial. Hay mejor pronóstico, en aquellos pacientes que tienen una remisión superior a dos años. Sin embargo, cuando

aparecen metástasis a distancia, este factor no es estadísticamente significativo para predecir el curso clínico de la enfermedad (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-1.5 Tratamiento quirúrgico. Se encuentra mayor supervivencia en aquellos pacientes a los que se les realizó disección ganglionar profiláctica, comparados con los que solamente se les practicó una excisión amplia del tumor (Balch y cols., 1.985). En otros estudios, la disección profiláctica no reportó beneficios (Sim y cols., 1.978) (Veronesi y cols., 1.980).

I-1.5-1.6 Termografía. De gran utilidad en nuestro departamento. El MM, en una gran mayoría de pacientes provoca una hipertermia, que se ha clasificado en siete categorías: Th1-i, Th1-f, Th2, Th3, Th4, Th5, Th5-L (Serrano, 1.978). En los que se encuentra hipertermia superior a 2 grados centrada al tumor (Th4), o que los desborda (Th5), o bien se dispone en forma de "llamarada térmica" (Th5-L), son de peor pronóstico, con riesgo de metástasis (Serrano y cols., 1.987).

I-1.5-2 FACTORES DE HISTOPRONOSTICO

I-1.5-2.1 Espesor del tumor. Breslow en 1.970, propuso como índice pronóstico, el espesor máximo del tumor, lo que implica el empleo de un micrómetro ocular, y cortes seriados absolutamente verticales (Dulanto, Armijo, 1.981). La medida del espesor es objetiva, Breslow recomendó que se hiciera desde el nivel superior de la capa granulosa, hasta la parte más profunda del tumor. Cuando el tumor está ulcerado, o hay fenómenos de regresión, la medida es difícil.

En SSM y MN, es el factor de histopronóstico más importante (Breslow, 1.970) (Balch y cols., 1.978) (McGovern y cols., 1.979) (Balch y cols., 1.979). Es un parámetro que define grupos de pacientes con diferente riesgo. Se han hecho varios subgrupos según el espesor:

- * Menor de 1 mm., buen pronóstico.
- * De 1-4 mm., grupo intermedio que exige vigilancia estrecha.
- * Mayor de 4 mm., pronóstico malo.

El riesgo de recidivas locales, satélites, y metástasis locales, es proporcional al espesor del tumor. Su conocimiento puede decidir la terapéutica a seguir (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-2.2 Ulceración. La presencia de ulceración, clínica o microscópica, es adversa para la supervivencia. Existe una relación directa entre ulceración y espesor del tumor (Balch y cols., 1.980) (McGovern y cols., 1.982) (Eldh y cols., 1.978) (Larsen, Grude, 1.979). Los tumores con más de 1,5 mm. de espesor estaban ulcerados en un 44 %. Los melanomas no ulcerados, con espesor inferior a 4 mm., tenían un porcentaje de supervivencia a los 5 años del 57%, mientras los que tenían un espesor superior a 4 mm., la supervivencia era del 44 %, y los MM ulcerados de este mismo espesor tenían un 8 % (Balch y cols., 1.985).

Según el diámetro de la ulceración, se hicieron dos subgrupos de pronóstico (Balch y cols., 1.980):

1) Ulceración menor de 6 mm. de diámetro, eran más delgados, con supervivencia a los 5 años

del 44 %.

2) Ulceración mayor de 6 mm., con un porcentaje de supervivencia a los 5 años del 5 %.

I-1.5-2.3 Nivel de invasión. Clark y su grupo en 1.969, clasifican los MM en 5 niveles:

Nivel I : Tumor intraepidémico.

Nivel II : Invasión fragmentada o espaciada de dermis papilar.

Nivel III : Invasión de dermis papilar.

Nivel IV : Invasión de dermis reticular.

Nivel V : Invasión de hipodermis.

En tumores polipoides, en mucosas, y cuando hay regresión que borra los límites anatómicos, los niveles de Clark pierden valor.

El nivel de invasión es un factor importante de riesgo. A mayor nivel de invasión, menor supervivencia (Balch y cols., 1.985). Pero, al mismo nivel de invasión, no corresponde el mismo espesor, por lo que en algunas localizaciones es preferible el

espesor (Eldh y cols., 1.978) (Van der Esch y cols., 1.981) (Prade y cols., 1.982). En otras ocasiones, como la ulceración, se prefiere el nivel (Dulanto, Armijo, 1.981).

I-1.5-2.4 Patrones de crecimiento. Los melanomas con patrón de crecimiento radial, tienen mejor pronóstico que los MN (McGovern y cols., 1.979). Cuando pacientes con SSM y MN se relacionan por su espesor, no se encontraron diferencias en la supervivencia; los SSM son de menor espesor y por tanto mejor pronóstico. Sin embargo, cuando los SSM, MN, y LMM se agruparon por el espesor, estos últimos tenían mejor pronóstico (McGovern y cols., 1.980).

I-1.5-2.5 Actividad mitótica. En 1.985, McGovern y Murad, llegaron a la conclusión, de que las mitosis debían ser contadas en un área de un 1 mm^2 , en aquella zona de la pieza donde fueran más numerosas. En general, los tumores de mayor espesor tienen mayor número de mitosis, que los tumores de menor espesor. Así los MN tiene más mitosis que los SSM (McGovern y cols., 1.979).

Según el número de mitosis por campo, se

describen tres grados (Bailly y cols., 1.974):

Grado 1: Menos de una mitosis por 5 campos.

Grado 2: Entre una mitosis por 5 campos y una mitosis por campo.

Grado 3: Entre una y más de una mitosis por campo.

Algunos patólogos, consideran que la actividad mitótica, no es un factor pronóstico, mientras que otros opinan lo contrario (Bailly y cols., 1.974).

I-1.5-2.6 Regresión. Para algunos (Paladugu y cols., 1.983) (Gromet y cols., 1.978) la regresión es un factor pronóstico adverso, mientras que para otros no (Balch y cols., 1.985) (McGovern y cols., 1.983) (Balch y cols., 1.978).

Hay que realizar una estimación de como era el espesor del melanoma antes de la regresión. Los pacientes con MM de poco espesor y con regresión parcial, tenían una supervivencia ligeramente inferior en un periodo de 5 años, igualandose las curvas de supervivencia a los 10 años; mientras que los pacientes con MM de mayor espesor y regresión parcial, tenían

mayor supervivencia que aquellos con MM de gran espesor sin regresión (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-2.7 Infiltración linfocitaria peritumoral. Cuando el melanoma invade profundidad, el infiltrado subyacente disminuye, mientras en periferia permanece igual (McGovern y cols., 1.981). Se ignora si la invasión del tumor es mayor porque disminuye el infiltrado, o bien la respuesta linfocitaria es menor porque hay mayor grado de invasión. Existe una correlación inversa entre el espesor del tumor y el infiltrado linfocitario (Balch y cols., 1.978) (McGovern y cols., 1.983). Los pacientes con escaso infiltrado, tienen lesiones con una media de espesor de 2,3 mm., mientras que aquellos con mayor infiltrado presentan una media de espesor de 1,1 mm. con una supervivencia superior (Balch y cols., 1.985). Cuando este factor se relaciona con el espesor, su significado pronóstico desaparece (McGovern y cols., 1.981).

I-1.5-2.8 Pigmentación. Es inversamente proporcional al espesor, y parece no influir en la supervivencia (McGovern y cols., 1.981). La supervivencia a los 10 años en pacientes con MM amelanótico fué del 54 %, mientras que en los MM pigmentados

fué del 73 % (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-2.9 Tipo celular. El melanoma puede estar constituido por uno o varios tipos celulares. Los más frecuentes son el epiteliode y fusiforme.

Los melanomas con células epiteliodes predominantes, presentan mejor pronóstico que los otros (McGovern y cols., 1.981).

I-1.5-2.10 Invasión vascular. La visualización de una invasión vascular es difícil. La presencia de células de melanoma en el interior de vasos sanguíneos y linfáticos, no significa que las metástasis ocurran de forma invariable, aunque el pronóstico empeora (Larsen, Grude, 1.979) (Little, 1.972) (Hornstein, Weidner, 1.973).

I-1.5-2.11 Nevus asociado. La presencia o ausencia de nevus, no tiene influencia en la supervivencia (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-2.12 Degeneración actínica Cualquier lesión melanocítica asociada a elastosis solar hace sospechar un LMM.

McGovern y cols., en 1.980, demostraron que la degeneración solar por sí misma no era la responsable del buen pronóstico de los LMM, ya que aquellos pacientes con melanomas del tipo SSM y MN, localizados en cabeza y cuello, que presentaban degeneración solar, tenían un pronóstico tan malo como en los que no tenían degeneración solar.

I-1.5-2.13 Número de metástasis ganglionares regionales. Existe una correlación directa entre el número de metástasis ganglionares y el índice de supervivencia. Se establecen 3 grupos (Balch y cols., 1.985):

Grupo I : Pacientes con un solo ganglio afecto: 65 % de supervivencia.

Grupo II : Pacientes con 2-4 ganglios afectados: 43 % de supervivencia.

Grupo III : Pacientes con 5 o más ganglios afectados: 22 % de supervivencia.

I-1.5-2.14 Localización de las metástasis a distancia. La piel, tejido subcutáneo, y ganglios linfáticos, son las localizaciones más frecuentes

de las metástasis a distancia. Los pacientes con este tipo de metástasis no viscerales, tienen una supervivencia del 46 %. Aquellos con metástasis viscerales, localizadas en pulmón, cerebro, hígado, y huesos, tuvieron una supervivencia del 18 % (Balch y cols., 1.985).

I-1.5-2.15 Número de metástasis a distancia.

Es un factor pronóstico muy significativo en pacientes con estadio III de melanoma. La media de supervivencia es de 7 meses en pacientes con una sola metástasis, de 4 meses para los que tenían dos metástasis, y de 2 meses para los que presentaban tres o más. Al cabo de un año, sobrevive el 36 % de los pacientes con una sola metástasis, el 13 % con dos metástasis, y ninguno de los que presentaban tres o más (Balch y cols., 1.985).

Del estudio de los factores de pronóstico, se deduce la necesidad de un análisis multifactorial. Los factores más importantes, según estadio, son (Balch y cols., 1.985):

Estadio I: Espesor - Ulceración - Estadio

patológico - Localización anatómica - Tipo de intervención quirúrgica inicial (Cascinelly y cols., 1.980) (Schmoeckel y cols., 1.983) (Day y cols., 1.981) (Eldh y cols., 1.978) (Prade y cols., 1.982) (Hacene y cols., 1.983) (Cox, 1.982).

Estadio II: Espesor - Ulceración - Número de ganglios invadidos (Balch y cols., 1.985).

Estadio III: Número de metástasis a distancia - Localización de metástasis a distancia - Tiempo libre de enfermedad (Balch y cols., 1.985).

En otro análisis multifactorial en estadio III de melanoma (Presant, Bartolucci, 1.982), los factores determinantes de supervivencia fueron: Estado de actividad del tumor - No afectación hepática - Sexo femenino - Invasión osea aislada.

I-1.6 DIAGNOSTICO

El diagnóstico de los MM, en general, no suele plantear problemas para el dermatólogo. Los factores clínicos e histológicos, decidiran el diagnóstico.

En ocasiones, hay que establecer diagnóstico diferencial:

I-1.6-1 TUMORES PIGMENTADOS

I-1.6-1.1 BENIGNOS:

- Verruga Seborreica.
- Nevus Pigmento-celulares.
- Nevus Azul.
- Histiocitoma Pigmentado.
- Angioma Trombosado.

I-1.6-1.2 MALIGNOS:

- Epitelioma Basocelular Pigmentado.
- Enfermedad de Bowen Pigmentada.

I-1.6-2 TUMORES AMELANOTICOS

I-1.6-2.1 BENIGNOS:

- Botriocoma.
- Verrugas plantares.
- Melanoma juvenil de Spitz-Allen.

I-1.6.2-2 MALIGNOS:

- Fibroxantoma Atípico.
- Carcinoma espinocelular.
- Acrospiroma Ecrino Maligno.
- Micosis Fungoide.
- Enfermedad de Paget Extramamaria.
- Tumor de Merkel.
- Dermato-Fibrosarcoma de Darier-Ferrand.
- Fibrosarcoma.

I-1.7 INMUNOLOGIA

Varias razones hacen que el melanoma maligno sea un buen modelo para estudiar la inmunología tumoral (Klein, 1.973). Es una lesión accesible, crece bien in vitro y posee un marcador específico, los melanosomas que lo diferencian de las demás células. Disponemos de una clasificación, bien definida, que relaciona datos clínicos e histológicos con el pronóstico (Breslow, 1.970)(Clark, 1.967)(McGovern, 1.982), y varios signos indican que los linfocitos están implicados en el control local de los melanomas primitivos (Cesa-

rini, Roubin, 1975)(Roubin y cols., 1975).

En un 3 % de melanomas primitivos se producen signos de regresión espontánea (Everson, 1.964), un 11 % de casos representan en su evolución un vitíligo asimétrico debido a la destrucción de melanocitos y en un 40 % de tumores primitivos coexisten signos microscópicos de progresión y regresión (Levine, 1.980)(Lewis, Copeman, 1.972).

La regresión espontánea se puede considerar como el resultado de una respuesta inmune del huésped frente al tumor, aunque no existan nada mas que datos indirectos que sugieran esta posibilidad. Estos datos, en un principio esperanzadores, han impulsado el conocimiento de los diferentes aspectos relacionados con la inmunología del melanoma.

Consideraremos dos apartados:

1) Antígenos de las células del melanoma, capaces de desencadenar una respuesta inmune.

2) Estado inmunitario general del paciente portador de MM.

I-1.7.1 ANTIGENOS DEL MELANOMA

Para caracterizar los antígenos del melanoma se han realizado varias técnicas, como las pruebas de hipersensibilidad cutánea con extractos tumorales (Heberman y cols., 1.975)(Reisfeld y cols., 1.977), empleo de sueros de pacientes curados (Houghton y cols., 1.980), el aislamiento de marcadores específicos, solubles en el suero y detectables en la orina, tales como una proteína de 15.000 daltons (Bennett y cols., 1.980), la 5-S Cisteinil-dopa (Rorsman y cols., 1.973) y la tirosinasa (Menon, Haberman, 1.969).

Mediante la tecnología de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales se ha impulsado considerablemente el estudio antigénico de los melanomas (Brown y cols., 1.980). La mayoría de anticuerpos monoclonales frente a melanomas, se han conseguido inmunizando ratones con distintas líneas celulares, extractos tumorales en CLK 3 M, medio de cultivo de líneas de melanoma, o con fragmentos de membrana celular obtenidos por sonicación o por lisis con detergentes no iónicos (NP40, Tritón)(Carrel y cols., 1.980). Los anticuerpos monoclonales han desplazado a los anticuerpos convencionales policlonales por

su homogeneidad, especificidad bien definida, producción ilimitada y disponibilidad (Herlyn y cols., 1.979).

Los antígenos del melanoma definidos por las diferentes técnicas se denominan Antígenos Asociados a Melanoma (MAA) y se dividen en tres grupos:

I) Antígenos de Clase I: son específicos de un determinado melanoma y se han detectado con sueros autólogos. Un ejemplo es el antígeno BD (Shiku y cols., 1.976).

II) Antígenos de clase II: se encuentran en melanomas de diferentes individuos, pero no en otros tipos de tumores. A este grupo pertenecen el antígeno AH (Shiku y cols., 1.976), el Mel-1 (Houghton y cols., 1.980), el p97 (Brown y cols., 1.981) y el definido por el AcMo 3.1 (Yen y cols., 1.979).

III) Antígenos de clase III: no son específicos a las células del melanoma y se pueden clasificar en tres grupos:

1) Antígenos Neuroectodérmicos.

Debido a su origen neuroectodérmico, las células del melanoma comparten antígenos con neuroblastomas, retinoblastomas, glioblastomas, astrocitomas y con células nerviosas en estadio fetal. Existen diversos antígenos de este tipo entre los que cabe mencionar, el grupo de los expresados solo por melanomas y astrocitomas definidos por los AcMo 19-19 y NO4B (Herlyn y cols., 1.980).

2) Antígenos Oncofetales.

La expresión de antígenos fetales en células malignas y adultas normales se considera como un trastorno en el control de la diferenciación celular (Jerry y cols., 1.976). Se han descrito antígenos fetales en la membrana de células de melanoma (Hollinshead, 1.975)(Gupta y cols., 1.979), y reacciones cruzadas del antisuero específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA) con líneas de melanoma (Dent y cols., 1.980).

3) Antígenos HLA-DR

Se comentan en otro apartado de la introducción; son moléculas que normalmente muestran una

expresión restringida a células inmunocompetentes (linfocitos B, linfocitos T activados y macrófagos) (Winchester, Kunkel, 1.979), aunque también se han descrito en células no linfoides (Natali y cols., 1.981) y en diversas neoplasias (Natali y cols., 1.981) entre las que se encuentra el melanoma (Winchester y cols., 1.978)(Pollack y cols., 1.980).

I-1.7-2 COMPETENCIA INMUNOLOGICA DE LOS PACIENTES DE MELANOMA

Una respuesta inmunológica efectiva requiere de un estímulo antigénico y de un sistema inmune capacitado para reconocerlo y lograr una proliferación adecuada de linfocitos T y B. El estudio del sistema inmune en los pacientes de melanoma se ha centrado en la valoración de pruebas relacionadas con la inmunidad inespecífica y en los ensayos destinados a dilucidar la respuesta específica frente a los antígenos del melanoma.

I-1.7-2.1 Evaluación general del Sistema Inmune.

Inmunidad Humoral. Las inmunoglobulinas IgG e

IgA se pueden encontrar ligeramente elevadas en el suero de los pacientes de melanoma (Cochran y cols., 1.976). El aumento de IgM frente a antígenos oncofetales se ha relacionado con una mayor supervivencia en pacientes en estadio II (Jones y cols. 1.981). En fases avanzadas de la enfermedad surge un aumento de la IgG4 (Daveau y cols., 1.977) que se produce en paralelo con el de los inmunocomplejos circulantes, permaneciendo su significado oscuro (Sztaba-Kania y cols., 1.981).

El complemento (CH50) es normal antes y después de la inmunoterapia con BCG en los estadios I y II de melanoma y tiende a elevarse en el estadio III (Knopf y cols., 1.979).

Inmunidad Celular. Reacciones de hipersensibilidad retardada cutánea. El dinitroclorobenceno (DNCB) es el antígeno que se ha empleado con mayor frecuencia para evaluar la reacción de hipersensibilidad de tipo IV. En los pacientes con melanoma se ha observado un menor porcentaje de reacciones positivas al DNCB en estadios avanzados de la enfermedad (Camacho y cols., 1.981). El empleo de esta técnica de forma rutinaria para valorar el pronóstico ha sido cuestionado

(Roses y cols., 1.979).

Los datos sobre los porcentajes en sangre periférica de los linfocitos T (Cochran y cols., 1.976) (Pichler y cols., 1.976) (Bernengo y cols., 1.978) y células nulas (Babusikova y cols., 1.976) en pacientes de melanoma son contradictorios y carecen de valor pronóstico. En los monocitos se han descrito signos de activación funcional (Nyholm, Currie, 1.978).

La respuesta blastogénica frente a distintos mitógenos decrece al progresar el melanoma (Degast y cols., 1.975). No se ha detectado ninguna diferencia en la respuesta a Concavalina A, entre pacientes en estadio II con tumor primario conocido y aquellos pacientes en el mismo estadio pero con un tumor primario de origen desconocido (Giuliano y cols., 1.980).

En estadios II y III, se ha observado una disminución de la actividad NK (Natural Killer) (Peter y cols., 1.976), pero no existe relación entre la actividad citotóxica natural y las reacciones específicas del huesped frente al melanoma (Devries y cols., 1.974) (Irie y cols., 1.974).

(Roses y cols., 1.979).

Los datos sobre los porcentajes en sangre periférica de los linfocitos T (Cochran y cols., 1.976) (Pichler y cols., 1.976) (Bernengo y cols., 1.978) y células nulas (Babusikova y cols., 1.976) en pacientes de melanoma son contradictorios y carecen de valor pronóstico. En los monocitos se han descrito signos de activación funcional (Nyholm, Currie, 1.978).

La respuesta blastogénica frente a distintos mitógenos decrece al progresar el melanoma (Degast y cols., 1.975). No se ha detectado ninguna diferencia en la respuesta a Concavalina A, entre pacientes en estadio II con tumor primario conocido y aquellos pacientes en el mismo estadio pero con un tumor primario de origen desconocido (Giuliano y cols., 1.980).

En estadios II y III, se ha observado una disminución de la actividad NK (Natural Killer) (Peter y cols., 1.976), pero no existe relación entre la actividad citotóxica natural y las reacciones específicas del huesped frente al melanoma (Devries y cols., 1.974) (Irie y cols., 1.974).

I-1.7-2.2 Reacciones Inmunológicas Específicas del Melanoma.

Existen argumentos a favor de la existencia de un mecanismo de vigilancia inmunológica que elimina las células neoplásicas incipientes (Klein, 1.973) (Oettgen, 1.979), aunque no se encuentra una correlación entre el aumento de la incidencia de tumores y el descenso en el estado de inmunocompetencia. En el caso del melanoma hay evidencias de la existencia de antígenos específicos del tumor, aunque se desarrolla en pacientes sin alteración del sistema inmunitario, por lo que debe existir un mecanismo de escape al control del sistema inmune que posibilite el desarrollo del tumor (Peter, 1.983).

Los tumores sólidos, entre ellos el melanoma, crecen en varias etapas cada una de ellas representada por una clona de células tumorales que reemplaza a las otras mostrando cambios en sus fenotipos (Klein, 1.973). Los datos histológicos existentes confirman este tipo de evolución para el melanoma (Cesarini, Roubin, 1.975) (Clark, 1.967) (McGovern, 1.982). Así, un melanoma de extensión superficial necesita entre 3 y 5 años para adquirir carácter invasor.

Durante este tiempo las variantes celulares se desarrollan en íntimo contacto con un denso infiltrado de linfocitos y macrófagos. Es evidente que durante el proceso de inmunoselección, las células que muestren una baja expresión antigénica o sean capaces de modular los antígenos específicos del tumor, escaparan al control inmunológico (Peter, 1.983). Hay que considerar además que la pérdida de antígenos de histocompatibilidad de clase I por parte de las células tumorales impide a los linfocitos T citotóxicos el reconocimiento y la lisis del tumor (Ruiter y cols., 1.982). Otro mecanismo de escape al control inmunológico, sería la liberación de antígenos por las células tumorales que bloquearían la acción de los linfocitos T y B saturando el sistema retículo endotelial por la formación de inmunocomplejos (Peter, 1.983).

* Reacciones Humorales.

In vitro se han desarrollado distintas reacciones serológicas frente a células autólogas (Carey y cols., 1.976) y alogénicas (Cornain y cols., 1.975) de melanoma, aunque por su baja frecuencia carecen de valor pronóstico.

* Reacciones Celulares.

Se han empleado las pruebas de hipersensibilidad retardada cutánea con extractos de melanomas autólogos (McCabe y cols., 1.978), para poner de manifiesto el grado de sensibilización frente al tumor. En general, el grado de reactividad decrece con la progresión de la enfermedad (Fass y cols., 1.970).

* Citotoxicidad mediada por células.

El empleo de células de melanoma como diana en ensayos de microcitotoxicidad durante largos periodos de incubación en presencia de linfocitos autólogos, ha demostrado la lisis específica de estas células tumorales (Takasugi, Klein, 1.970). El problema mayor de este tipo de ensayos reside en la heterogeneidad de los mecanismos efectores que se miden. Junta a la inhibición del crecimiento tumoral mediado por los fagocitos mononucleares, también se mide la citotoxicidad mediada por las células NK y los linfocitos T (Peter y cols., 1.975). Actualmente con el desarrollo de las técnicas de cultivo y clonación de los linfocitos T, se ha conseguido aislar clones que reconocen de forma específica a células de melanoma (Anichini

y cols., 1.985).

* Ensayo de inhibición de la migración leucocitaria (LMI).

Con LMI se han detectado reacciones específicas frente al melanoma (Boddie y cols., 1.976), que dependen del estadio evolutivo. El 58 % de pacientes con melanoma en estadio I, presentan una inhibición de la emigración leucocitaria en presencia de extractos de melanoma; en el estadio II el porcentaje es del 65 % y en el estadio III del 29 % (Morrison y cols., 1.979).

* Ensayo de inhibición de la adherencia leucocitaria (LAI).

Esta técnica, modificación de la LMI, mide la inhibición de la adherencia al vidrio de los leucocitos de sangre periférica en presencia de extractos tumorales (Halliday y cols., 1.975). Su aplicación en pacientes con melanoma dá porcentajes bajos de falsos positivos (Halliday y cols., 1.980).

El valor de estas dos pruebas para monitorizar la respuesta inmune celular, no se acepta por todos

(Kristensen, 1.980). Para valorar la eficacia y fiabilidad de una prueba de laboratorio, hay que tener en cuenta que una positividad in vitro a menudo no se correlaciona con una inmunidad efectiva antitumor in vivo (Peter, 1.983).

I-1.8 TRATAMIENTO

I-1.8-1 TRATAMIENTO QUIRURGICO.

I-1.8-1.1 Tratamiento del Tumor Primario.

El tratamiento quirúrgico del MM, se fundamenta en su buen diagnóstico clínico e histológico, que facilite factores de histopronóstico, fundamentalmente nivel de invasión y espesor del tumor (Serrano, 1.983). Para obtener factores de histopronóstico y confirmación diagnóstica, es imprescindible extirpación-biopsia con un margen en superficie de 0,5 cm., y en profundidad hasta fascia muscular. La biopsia parcial no facilita factores de histopronóstico y su utilidad es mínima (Milton, Shaw, 1.983). Normalmente la extirpación-biopsia se realiza con estudio intraoperatorio, mediante cortes en criostato y tinción rápida,

que permite obtener nivel de invasión y espesor de Breslow en unos 15 minutos (Dulanto, Serrano, 1.981).

De acuerdo con los resultados histológicos, extirpación con un margen de 3-5 cm. de diámetro, que se amplía de forma oval con el vértice hacia áreas ganglionares (Milton, 1.977) (Serrano, 1.983). En profundidad se incluye fascia muscular, aunque otros prefieren no incluirla (Olson, 1.966). El defecto resultante, se cubre de acuerdo con los principios básicos de la cirugía dermatológica, aunque en general se prefieren injertos dermo-epidérmicos (Milton, Shaw, 1.983).

I-1.8-1.2 Tratamiento Profilactico de Nevus Pigmento-Celulares.

Los nevus localizados en palmas, plantas, genitales, mucosas y los sometidos a traumatismos continuos, deben extirparse (Milton, Shaw, 1.983). Es razonable extirpar cualquier nevus en pacientes con ansiedad que acuden a las consultas solicitandolo (Serrano, 1.983).

En nevus gigantes pilosos congénitos, el

peligro de malignización varía del 2-40 % (Greeley y cols., 1.965) (Kaplan, 1.974). Se debe aconsejar observación y vigilar cambios bruscos de color o desarrollo rápido de nódulos, y según accesibilidad quirúrgica, extirparlos (Pers, 1.963) (Reed y cols., 1.975).

I-1.8-1.3 Tratamiento de Areas Ganglionares.

Se discute si procede (Balch y cols., 1.979) (Balch, 1.980) (Milton y cols., 1.982), o no (Sim y cols., 1.978) (Veronesi y cols., 1.980) la disección ganglionar profiláctica.

Curvas de supervivencia, demuestran, según autores mayor tiempo de supervivencia cuando se realiza la disección ganglionar profiláctica (Balch y cols., 1.979) (Balch, 1.980) (Milton y cols., 1.982), o todo lo contrario (Sim y cols., 1.978) (Veronesi y cols., 1.980). De todas formas, con Milton, la mayoría de centros, hoy aceptan la conveniencia de realizar disección ganglionar en los tumores de más de 3 mm. de espesor.

I-1.8-1.4 Tratamiento de la Enfermedad Avanzada.

Si el tumor primitivo o sus metástasis están localizadas, pueden extirparse, aunque recidiven. Sirve para aliviar los síntomas en los últimos meses de vida del paciente, y disminuir la masa tumoral, facilitando la acción de otros procedimientos terapéuticos (Dulanto, Serrano, 1.981).

Las metástasis internas pueden tratarse por cirugía, cuando son únicas.

I-1.8-2 QUIMIOTERAPIA

I-1.8-2.1 Quimioterapia General.

Muchas drogas han demostrado su eficacia en el tratamiento de las metástasis del MM. El DTIC (di-metiltriazeno-imidazol-carboxamida), Actinomicina D, Procarbazona, Hidroxiureas, proporcionan tasas de respuesta objetiva de alrededor del 20-25 % (Bellet y cols., 1.979). Con Cis-platino se han obtenido regresiones importantes en formas metastásicas (Chary y cols., 1.972).

La combinación de estas drogas, administradas por vía general, proporciona respuestas terapéuticas variables. La combinación BCNU-Hidroxiurea-DTIC, dá un 32 % de respuestas, con una media de supervivencia de 26 semanas en pacientes en estadio II (Constanzi y cols., 1.980); se obtiene un 40 % de respuestas con la asociación Bleomicina-Vincristina-CCNU-DTIC (Seigler y cols., 1.979) en pacientes en estadio II; y un 43 % con las perfusiones continuas de Vincalécoblastina-Bleomicina-Cis-platino (Nathanson y cols., 1.981).

La eficacia relativa, pero valiosa de estos tratamientos, ha conducido a proponer terapéuticas adyuvantes en el MM estadio I con mal pronóstico. El espesor del tumor es el factor más importante para valorar si procede un tratamiento médico adyuvante. A partir de 2 mm. de espesor se recomienda el empleo profiláctico de quimioterapia.

Estudios recientes, valoran la utilidad real de la quimioterapia (Jacquillat y cols., 1.975). Comparan grupos de pacientes con las mismas características clínicas e histológicas, que se tratarán solo con cirugía, o con cirugía y quimioterapia. Los resulta-

dos, variables, no son concluyentes en cuanto a la eficacia del empleo de quimioterápicos de forma sistemática.

I-1.8-2.2 Quimioterapia Regional.

Se utiliza en MM localizados en los miembros con diseminación loco-regional clínica o pontecial. Se puede hacer de dos formas, o bien con quimioterapia regional en perfusión extracorpórea (Creech y cols., 1.958) (Krementz, Ryan, 1.972), o quimioterapia regional por infusión intraarterial (Golomb, 1.975) (Banzet y cols., 1.975).

Estas técnicas, útiles en estadio II, pueden asociarse a hipertermia regional (Cavaliere y cols., 1.967) (Stehlin y cols., 1.975).

I-1.8-3 RADIOTERAPIA.

Para muchos autores, el MM es un tumor radiorresistente (Barranco y cols., 1.971) (Hornsey, 1.972) (Hornsey, 1.972) (Withers, Marter, 1.976). Esta resistencia se explicaría, por una proporción de células hipoxicas importante, menos radiosensibles,

y por su poder de reparación celular y tisular superior al de otros tumores (Dewey, 1.971).

Por el contrario para otros (Dancuart y cols., 1.980) (Overgaard, 1.980), la radioterapia es un método a veces útil. Se puede emplear según varias técnicas.

I-1.8-3.1 Radiación de Melanoma Primitivo. Se realiza electronterapia, que proporciona una dosis superficial correcta y no irradia profundidad.

I-1.8-3.2 Radiación de Metástasis. Se realiza según el órgano afecto.

La asociación hipertermia-radioterapia, ha demostrado una potencialización de los efectos de la radiaciones ionizantes (Bicher y cols., 1.980) (Kim y cols., 1.977) (Kim y cols., 1.978).

Las indicaciones de la radioterapia se resumen:

* De forma paliativa o sintomática, cuando existen metástasis a distancia.

* En el MM primario cutáneo, sólo se utilizará cuando el paciente no se pueda operar.

* Recidivas cutáneas en determinadas localizaciones.

I-1.8-4 INMUNOTERAPIA

Demostrada la importancia de la respuesta inmune en los tumores malignos en general y en melanomas en particular, la inmunoterapia se muestra como una posibilidad terapéutica de primer orden.

La detección de antígenos específicos en células cancerosas (Macher y cols., 1.975), la existencia de mecanismos de defensa específicos antitumor (Oettgen, 1.979) y la mayor incidencia de tumores en pacientes inmunocomprometidos (Penn, 1.979), son los pilares en que se fundamenta la inmunoterapia.

De acuerdo con ello, se han planteado tres modelos de inmunoterapia:

1) Estimulación no específica de la respuesta inmune: mediante BCG, *Corynebacterium parvum*, factor de transferencia, levamisole y otros (Gutterman y col., 1.974).

2) Inmunización específica con células tumorales autólogas o alogénicas en unión con un adyuvante inespecífico como BCG.

3) Combinaciones de inmunoestimulantes con quimioterapia y radioterapia.

Después de una serie de resultados alentadores (Gutterman y cols., 1973) (Gutterman y cols., 1.974) (Eilber y cols., 1.976) (Ikonopisov, 1.975) (Grant y cols., 1.974) (Bonadonna y cols., 1.978), se han publicado diversos trabajos con datos negativos en cuanto a las ventajas de la inmunoterapia en el melanoma (Currie, McElwain, 1.975) (Pinsky y cols., 1.973). Uno de estos trabajos es el N° 6 del WHO MELANOMA COOPERATIVE GROUP, donde se prueba como terapeutica adyuvante a la cirugía, la BCG, DTIC, o BCG más DTIC, en pacientes de melanoma en estadio II. No se encontró, con ninguna de las terapeuticas adyuvantes empleadas, mejores resultados que sólo con cirugía (Veronesi, Bonadonna, 1.982). Un subgrupo de pacientes de melanoma que presentan una diseminación limitada a los ganglios regionales (menos de tres ganglios afectados y una reacción cutánea inicial a la BCG negativa) pueden obtener mejores resultados con la terapeutica adyuvante de la BCG (Peter y cols., 1.978). Sin embargo, la BCG,

el *Corynebacterium parvum*, el virus vaccinia y otros agentes inmunoterapéuticos de la primera generación han fallado en su aplicación a pacientes en estadios II y III de melanoma maligno.

Desgraciadamente no existen trabajos prospectivos sobre la aplicación de la BCG intralesional en melanomas primitivos, seguida de cirugía radical. Se ha descrito, en tumores humanos de cabeza y cuello, que la aplicación intralesional de BCG en las lesiones primitivas seguida de cirugía radical, es un medio eficaz para prevenir la metástasis a distancia (Hersey y cols., 1.981) (Bier y cols., 1.981).

A pesar de que los resultados son por ahora escasos, la inmunoterapia debe seguir como uno de los focos de investigación fundamentales en melanomas. Según los datos existentes es evidente que no solo la inmunoterapia ha fracasado para cambiar el pronóstico en pacientes con alto riesgo, en estadio I, II y III, sino también otras terapéuticas adyuvantes como la quimioterapia y radioterapia. Además, la inmunoterapia es la terapéutica menos tóxica y presenta ventajas en la enfermedad locoregional limitada del melanoma, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos agentes

estimuladores del sistema inmune.

Se han empleado otros inmunoestimulantes como el levamisole, el interferón, e inductores del interferón como el PolyA/PolyU (Peter, 1.983).

Los anticuerpos monoclonales específicos del melanoma han abierto un campo nuevo en la inmunoterapia. Se han aplicado unidos a sustancias citotóxicas como la Ricina-A (Blythman y cols., 1.981), para la perfusión locoregional ya que su administración general tiene el inconveniente de que el complejo AcMo-Toxina se degrada rápidamente en el hígado. Otra posibilidad que limita el AcMo es la aparición de factores bloqueantes séricos y procesos de modulación antigénica y heterogeneidad fenotípica de las clonas tumorales (Ritz, Schlossman, 1.982).

Otro campo de gran interés dentro de la inmunoterapia se ha logrado con la posibilidad de mantener in vitro, por medio de interleukina 2 (IL-2) a linfocitos T citotóxicos autólogos y células NK (Beverly, 1.979) (Brooks y cols., 1.982) (Gillis, Smith, 1.977). Se han establecido líneas celulares citotóxicas específicas de tumores en varios modelos

animales frente a leucemias (Zarling, Bach, 1.979) y melanomas (Hersey y cols., 1.981) humanos. La eficacia terapéutica de la reinyección de CTL (linfocitos T citotóxicos) específicos anti-tumor y mantenidos in vitro, se ha demostrado tanto en el modelo experimental murino como en el humano (Fernandez-Cruz y cols., 1.982) (Mills y cols., 1.980). Los problemas principales que plantea este método de inmunoterapia, surgen de la distribución de los linfocitos T in vivo después de su reinyección. Se ha descrito que estas células se localizan de manera preferente en los pulmones en las cuatro primeras horas y posteriormente se redistribuyen en el hígado y en el bazo durante las siguientes 24 horas. Esta distribución dificulta que exista un número adecuado de linfocitos T citotóxicos en el lugar donde se encuentra el tumor. No obstante esta técnica es la que ofrece por el momento mayores posibilidades de éxito dentro de la inmunoterapia (Lotze y cols., 1.980).

Otros inmunoestimulantes de empleo reciente, son las hormonas tímicas, extraídas del timo bovino (timoestimulina) o porcino, que son capaces de estimular la respuesta inmune de forma inespecífica (Bergesi, Falchetti, 1.977; Falchetti y cols., 1.977; Falchetti

y cols., 1.979) y, en general, potencian las funciones del linfocito T.

Para comprobar su acción y eficacia se han realizado diversas experiencias in vivo e in vitro:

- Después de la incubación de linfocitos inmaduros, obtenidos de médula ósea y sangre periférica, con hormonas tímicas, se potencia la respuesta proliferativa de mitosis, aumenta el número de linfocitos T, se intensifica el efecto citotóxico de las células NK y maduran los linfocitos (Fiorilli, 1.977).
- En animales a los que se extirpó el timo, en periodo neonatal, se confirma el valor sustitutivo de las hormonas tímicas. Igualmente, se acorta el tiempo de rechazo de un alotrasplante e incrementa la reacción injerto contra huésped. Con la edad, disminuye el número total de linfocitos T y la respuesta inmune en general, situación que se modifica con la administración de hormona tímica (Bliznakov y cols., 1.978; Doria,

1.980).

Estos primeros resultados experimentales se comprobaron clínicamente con una mejoría considerable de las condiciones del paciente y regresión total o parcial de algunos signos o síntomas de la enfermedad (Businco, 1.977; Nicola, Tovo, 1.978; Tovo, 1.970).

En pacientes con MM, se produce una marcada depresión de linfocitos T circulantes, sobre todo en estadios avanzados. En éstos enfermos, después de administrar hormonas tímicas (Bernengo y cols., 1.979; Bernengo y cols., 1.983), se produce un aumento de linfocitos T en el 85 % en estadio I y en el 70 % en estadio II, así como una prolongación del intervalo libre de metástasis y aumento del tiempo de supervivencia en comparación con otros tratamientos.

I-2 ANTIGENOS HLA

Dausset en 1.958, inició el estudio del sistema HLA. Comprobó que algunos sueros humanos aglutinaban leucocitos de otros individuos; y que el suero de mujeres embarazadas reconocían como extraños, aglutinándolos, a ciertos antígenos del feto, los que procedían del padre (Payne, Rolfs, 1.958). A estos antígenos los denominó HL-A (H: humano, L:leucocito, y A: antígeno).

Este método de aglutinación, presentaba elevado índice de falsos positivos, por lo que se abandonó y sustituyó por la Técnica de microcitotoxicidad (Terasaki, McClelland, 1.964), que emplea linfocitos aislados con Ficoll-Hypaque que se incuban con el antisuero añadiendo complemento. Si se produce reacción antígeno HLA-anticuerpo se fija el complemento, con lisis celular. Con este método se realiza hoy el tipaje HLA (Bodmer y cols., 1.976).

En la actualidad se dispone de distintos sueros ya preparados que facilitan el estudio del sistema. La WHO (World Health Organization) establece y regula la terminología de los distintos antígenos.

Para definir la especificidad serológica de una población con gran diversidad genética, hay que utilizar el mayor número de sueros frente a un panel amplio de antígenos. Para establecer que dos sueros pertenecen a un mismo grupo, es decir reconocen el mismo antígeno, se siguen métodos estadísticos.

En primer lugar una tabla de contingencia 2x2, luego el test exacto de Fisher, χ^2 , y coeficiente de correlación (r) (Klein, 1.982).

Desde los trabajos iniciales de Dausset (1.958), se han caracterizado hasta un total de 124 antígenos HLA, conocidos hoy, proceso dinamico, que posiblemente al concluir nuestro trabajo ya se hayan demostrado más.

En 1.967, se definieron dos grupos de antígenos, que se denominaron LA (Payne y cols., 1.964) y 4 (Van Rood, Leeuwen, 1.963). Cada uno de los grupos tenía tres especificidades antigénicas (Curtoni y cols., 1.967).

En 1.970 (Allen y cols., 1.970), el grupo de antígenos definidos aumento a 14, y se introduce en la denominación la "W", inicial de Workshop, que se aplica a aquellos antígenos en estudio y solo aceptados provisionalmente.

Continuan descubriendose nuevos antígenos, y en 1.972 Dausset y Colombani, reconocen 41, y tres años después, en 1.975 (Kismeyer-Nielsen, 1.975), se propusieron cuatro grandes grupos; los tres primeros definidos por técnicas serológicas, se denominaron HLA-A, HLA-B, HLA-C, y el cuarto obtenido en cultivo mixto de linfocitos, al que se llamo HLA-D. En el HLA-A se incluyó el antígeno LA y en el HLA-B el antígeno 4.

En 1.977 (Bodmer y cols., 1.978), ya se dispone de 77 antígenos que nacen en su mayoría

como consecuencia de la mejor definición de los ya conocidos, y se describe un nuevo grupo, el HLA-DR, que solo se expresan en linfocitos B, macrófagos y otras células accesorias.

Tres años después, en 1.980 se describieron nuevos antígenos HLA-B, C, D y DR. Se acordó conservar la "W" en todos los antígenos HLA-C, aunque ya fuesen aceptados, para evitar confusiones con el complemento (C). Se consideraron nuevas series antigénicas, parecidas al DR, denominadas DC (Tanigaki, Tosi, 1.982), MB (Duquesnoy y cols., 1.979), y MT (Park y cols., 1.980).

En la reunión de expertos en 1.984 (Bodmer y cols., 1.984), se definen nuevos antígenos. Se estableció la clasificación en dos grandes grupos. Los de clase I, que comprende los HLA-A, HLA-B, HLA-C con sus distintos subgrupos, y los de clase II, con los demás, DR, DP y DQ. En el último workshop de 1.987, se han definido nuevas especificidades antigénicas (Tabla 3).

I-2.1 BASES GENÉTICAS DEL SISTEMA HLA

Para cada serie de especificidad antigénica del sistema HLA, existe un locus a nivel cromosómico. Las diferentes variantes en cada locus, son los alelos. Cada alelo tiene una determinada especificidad. Los alelos de los genes de histocompatibilidad se transmiten en bloque, de forma que un individuo recibe un sólo alelo por serie especificada, de cada uno de sus progenitores. El conjunto de alelos, uno para cada especificidad, que se transmiten en bloque, constituyen un haplotipo (Cepellini y cols., 1.967).

Tabla 3. Lista completa de especificidades HLA (Workshop, 1.987).

HLA						
A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQw1	DPw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR2	DQw2	DPw2
A3	B8	Cw3	Dw3	DR3	DQw3	DPw3
A9	B12	Cw4	Dw4	DR4	DQw4	DPw4
A10	B13	Cw5	Dw5	DR5	DQw5(w1)	DPw5
A11	B14	Cw6	Dw6	DRw6	DQw6(w1)	DPw6
Aw19	B15	Cw7	Dw7	DR7	DQw7(w3)	
A23(9)	B16	Cw8	Dw8	DRw8	DQw8(w3)	
A24(9)	B17	Cw9(w3)	Dw9	DRw9	DQw9(w3)	
A25(10)	B18	Cw10(w3)	Dw10	DRw10		
A26(10)	B21	Cw11	Dw11(w7)	DRw11(5)		
A28	Bw22		Dw12	DRw12(5)		
A29(w19)	B27		Dw13	DRw13(w6)		
A30(w19)	B35		Dw14	DRw14(w6)		
A31(w19)	B37		Dw15	DRw15(2)		
A32(w19)	B38(16)		Dw16	DRw16(2)		
Aw33(w19)	B39(16)		Dw17(w7)	DRw17(3)		
Aw34(10)	B40		Dw18(w6)	DRw18(3)		
Aw36	Bw41		Dw19(w6)			
Aw43	Bw42		Dw20	DRw52		
Aw66(10)	B44(12)		Dw21	DRw53		
Aw68(28)	B45(12)		Dw22			
Aw69(28)	Bw46		Dw23			
Aw74(w19)	Bw47		Dw24			
	Bw48		Dw25			
	B49(21)		Dw26			
	Bw50(21)					
	B51(5)					
	Bw52(5)					
	Bw53					
	Bw54(w22)					
	Bw55(w22)					
	Bw56(w22)					
	Bw57(17)					
	Bw58(17)					
	Bw59					
	Bw60(40)					
	Bw61(40)					
	Bw62(15)					
	Bw63(15)					

...///...

Tabla 3. Lista completa de especificidades HLA (Workshop, 1.987) (continuación).

HLA						
A	B	C	D	DR	DQ	DP
	Bw64(14)					
	Bw65(14)					
	Bw67					
	Bw70					
	Bw71(w70)					
	Bw72(w70)					
	Bw73					
	Bw75(15)					
	Bw76(15)					
	Bw77(15)					
	Bw4					
	Bw6					

Las cifras entre paréntesis corresponden a especificidades compartidas por dos o más antígenos. Los antígenos HLA-B van asociados a Bw4 o a Bw6, mientras que los antígenos HLA-DR se asocian a DRw52 ó a DRw53.

De acuerdo con las leyes generales de la genética, todo individuo, tiene un 25 % de posibilidades de presentar el mismo haplotipo que su hermano (Sachs, 1.984).

Es posible, que se establezcan cruces entre dos haplotipos, en la fase de meiosis de los gametos sexuales, que pueden efectar tanto a antígenos HLA de clase I, como a los de clase II. A esta eventualidad, se denomina "entrecruzamiento" (Crossing-over) (Kissmeyer-Nielsen y cols., 1.969).

Debido a las distintas combinaciones entre diversos locus del sistema HLA en una comunidad, se podría asumir que después de un tiempo suficiente se alcanzaría un equilibrio en la distribución de los alelos de cada locus, que sería definitorio de la comunidad (Baur y cols., 1.980) (Bodmer y Bodmer, 1.978); situación comprobada por distintos autores en comunidades diferentes (Bodmer y Bodmer, 1.978) (Snell y cols., 1.976).

Los genes del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC), se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 (Breuning y cols., 1.977). Su parte más centromérica es la D, que se subdivide en tres zonas: DP, DQ, DR. Esta región codifica los antígenos de histocompatibilidad de clase II. A continuación se encuentran los genes que codifican dos factores de la vía clásica de activación del complemento: C'2, C'4 y el factor B de la vía alternativa (Carroll y cols., 1.984). Estos factores del complemento por estar codificados en el área genética de los antígenos de histocompatibilidad reciben la denominación de moléculas de clase III.

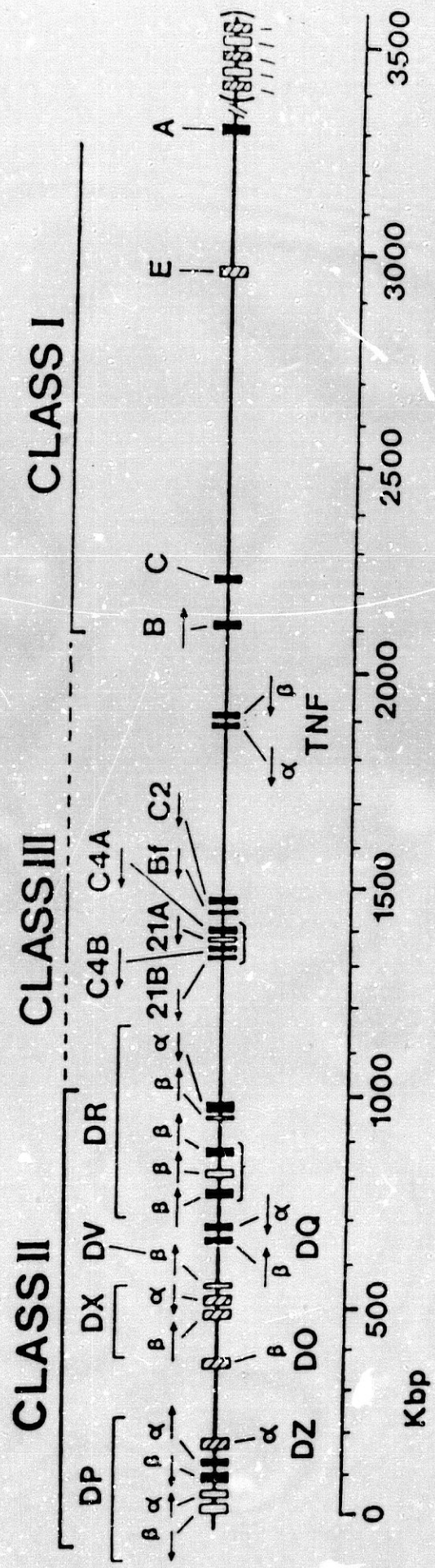


FIGURA 1

ESTRUCTURA DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Además en la región de clase III, se han descrito dos genes que codifican las enzimas adrenales del citocromo P-450, que son específicas para la hidroxilación en el carbono 21 de los esteroides (Dupont y cols., 1.985). En el mismo cromosoma se sitúan otros genes distintos a los del MHC, que codifican para la enzima málica citoplasmática (ME-1), el pepsinógeno urinario-5 (Pg5), la isoenzima fosfoglucomutasa 3 eritrocítica (PGM3) y la glioxilasa (GLO) (Bakker y cols., 1.979).

En la zona más telomérica del MHC se encuentran los genes que codifican para las moléculas de clase I, con tres locus denominados B, C y A, situados por este orden de izquierda a derecha. Dentro del mismo grupo se encuentran genes que codifican antígenos parecidos a los Qa (antígenos subpoblacionales linfoides) y T1a (antígenos expresados en timocitos y en algunas leucemias) murinos (Gazit y cols., 1.980) (Cotner y cols., 1.981) (Fig. 1).

El sistema MHC del ratón se denomina H-2 y se localiza en el cromosoma 17. Los locus K, D y L del sistema H-2 murino codifican para antígenos de clase I, y por tanto se corresponden con los locus ABC del sistema HLA humano, además en este mismo grupo se incluyen genes relacionados con los Qa y T1a murinos. Los antígenos de clase II están codificados por la región Ia en el sistema H-2, que se subdivide en: IA, IE e IJ.

I-2.2 ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS HLA

1) Las moléculas de clase I codificadas por los locus A, B y C, están constituidas por una cadena

polipeptídica situada en la membrana citoplasmática, denominada cadena pesada con un peso molecular de 45.000 daltons. Unida a ella se encuentra una molécula de 12.000 daltons denominada beta 2-microglobulina.

2) Las moléculas de clase II codificadas por los genes de la región D tienen una estructura dimérica, con una cadena denominada alfa de peso molecular entre 25 a 33.000 daltons y otra beta de menor peso molecular, entre 24 y 29.000 daltons. La unión entre estas dos cadenas no es covalente. Asociada con las cadenas alfa y beta se ha descrito una tercera cadena gamma o cadena invariante porque no presenta polimorfismo.

3) Las moléculas de clase III son factores séricos del complemento, el C4, C2 y el factor B del sistema properdina.

I-2.2-1 ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE I

Beta 2-microglobulina. Aislada por Berggard y Bearn (1.968), en la orina de pacientes con alteración renal. Posteriormente se descubrió (Creswell y cols., 1.973), que estaba asociada con las moléculas HLA de clase I. Su peso molecular en SDS-PAGE es de 11.600 a 12.000 daltons.

Gates y cols., (1.981), lograron una secuenciación completa de esta proteína, que esta formada por 99 residuos de aminoácidos y presenta un puente disulfuro entre dos cisteínas. Existe bastante similitud entre la beta 2-microglobulina y el tercer dominio

CH3 de la porción constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Peterson y cols., 1.972).

Entre las beta 2-microglobulinas del hombre, raton, conejo y cobaya existe un alto porcentaje de similitud del 61-74 %, lo que indica que se ha conservado durante la evolución de las especies. En animales inferiores se han detectado proteínas con estructura parecida, que son capaces de formar complejos con las moléculas clase I de los antígenos HLA humanos.

La beta 2-microglobulina esta codificada por un gen que no se encuentra dentro del complejo HLA del cromosmo 6, sino en el cromosoma 15 (Goodfellow y cols., 1.975). En el raton también esta fuera del sistema H-2 ya que el gen codificante se localiza en el cromosoma 2 (Michaelson, 1.981) y el sistema H-2 se situa en el 17. En el hombre no se ha descrito polimorfismo para la beta 2-microglobulina, pero en el ratón se han observado dos formas moleculares que se diferencian por el aminoácido que ocupa la posición 85 (Gates y cols., 1.981).

La importancia de esta proteína reside en que es necesaria para el transporte y expresión de las cadenas pesadas de los antígenos HLA (Sege y cols., 1.981).

Gran interés tiene conocer la participación de la beta 2-microglobulina, en la constitución de los determinantes antigénicos reconocidos por anticuerpos monoclonales anti-HLA. Parece ser que esta proteína puede inducir modificaciones estructurales en las

cadenas pesadas HLA de clase I, que provocan el reconocimiento de determinantes antigénicos, como lo demuestra el hecho de que existan anticuerpos monoclonales que reaccionan sólo con las cadenas pesadas clase I, mientras que otros requieren la formación del complejo beta 2-microglobulina—cadena pesada, para unirse a los antígenos HLA clase I.

Antígenos A, B, C. Existen tres locus A, B, C que codifican para especificidades HLA de clase I. Los datos serológicos indican que existen 20 formas alélicas para el locus A, 40 para el B y 8 para el C (Bodmer y cols., 1.984).

El primer antígeno HLA de clase I, del que se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos fué el B7 (Strominger y cols., 1.980), se distinguen tres porciones: una extracelular formada por tres áreas de 90 residuos de aminoácidos, denominadas alfa 1, alfa 2, alfa 3. En el área alfa 2 hay un puente disulfuro que engloba a 63 aminoácidos, en el área alfa 3 existe otro puente disulfuro que abarca 86 aminoácidos. El único lugar de glicosilación se localiza a nivel del área alfa 1 en un residuo de Asn; otra transmembrana de 27 aminoácidos hidrofóbicos que permite atravesar la capa de lípidos de la membrana, y la tercera intracitoplasmática, incluye aproximadamente 38 residuos y sirve de anclaje a la célula (Lopez de castro y cols., 1.979).

Esta estructura básica (Fig. 2), se generalizó al resto de los antígenos de clase I. Estudios comparativos han demostrado que existe un alto grado de homología entre las diferentes moléculas de HLA,

sobre todo en la zona comprendida entre los aminoácidos 194 y 271.

Orr y cols., (1.979), postulan que la localización del determinante antigénico de las moléculas A2 y B7 podría localizarse entre los residuos 65-83, porque en ese área es donde se aprecian mayores divergencias en las secuencias de aminoácidos de estos antígenos.

Relación entre Antígenos HLA de Clase I e Inmunoglobulinas

La similitud entre la beta 2-microglobulina y el dominio CH3 de la IgG es del 28 % a nivel de estructura primaria. De las 11 posiciones idénticas para los dominios de las regiones constantes de las cadenas pesadas de todas las inmunoglobulinas, 10 son compartidos por la beta 2-microglobulina. Estas analogías incluyen aminoácidos poco frecuentes como cisteína, histidina y triptofano.

La molécula del antígeno B7, mostró que la región del segundo puente disulfuro era igual en un 30 % a la beta 2-microglobulina, y en un 35-38 % con las regiones constantes de otras inmunoglobulinas (Dayhoff, 1.972). Como en el caso de la beta 2-microglobulina las coincidencias recaen en aminoácidos poco frecuentes.

Las homologías detectadas entre los antígenos de clase I y las inmunoglobulinas sugieren que ambos tipos de moléculas tienen un gen ancestral común en la evolución (Peterson y cols., 1.972). Pero no

se han descrito en los antígenos de histocompatibilidad, regiones hipervariables ni diversificación somática como en las inmunoglobulinas. Y además no se ha observado ningún tipo de reordenamiento genético en la región que codifica las moléculas HLA de clase I como ocurre con los genes de las inmunoglobulinas.

I-2.2-2 ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE II

Los antígenos HLA de clase II están codificados por la región D, que se divide en tres áreas DP, DQ y DR que se corresponden con tres tipos de moléculas : HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR.

Los antígenos HLA de clase II tienen una estructura básica común. Poseen dos tipos fundamentales de cadenas unidas no covalentemente: la cadena alfa de peso molecular en SDS de 25 a 33.000 daltons, y la cadena beta de peso molecular de 24 a 29.000 daltons, y la cadena gamma o invariante, necesaria para el transporte y expresión de los antígenos HLA de clase II. Estas tres cadenas están ancladas en la membrana citoplasmática y se pueden dividir en tres regiones: extracelular, transmembrana e intracitoplasmática. La cadena alfa presenta en su porción extracelular un sólo dominio establecido por un puente disulfuro, mientras que la cadena beta tiene dos. La cadena invariante muestra una orientación invertida en relación a las cadenas alfa y beta (Fig. 3).

El conocimiento de la estructura de las moléculas HLA de clase II, se debe fundamentalmente al empleo de anticuerpos monoclonales, líneas mutantes

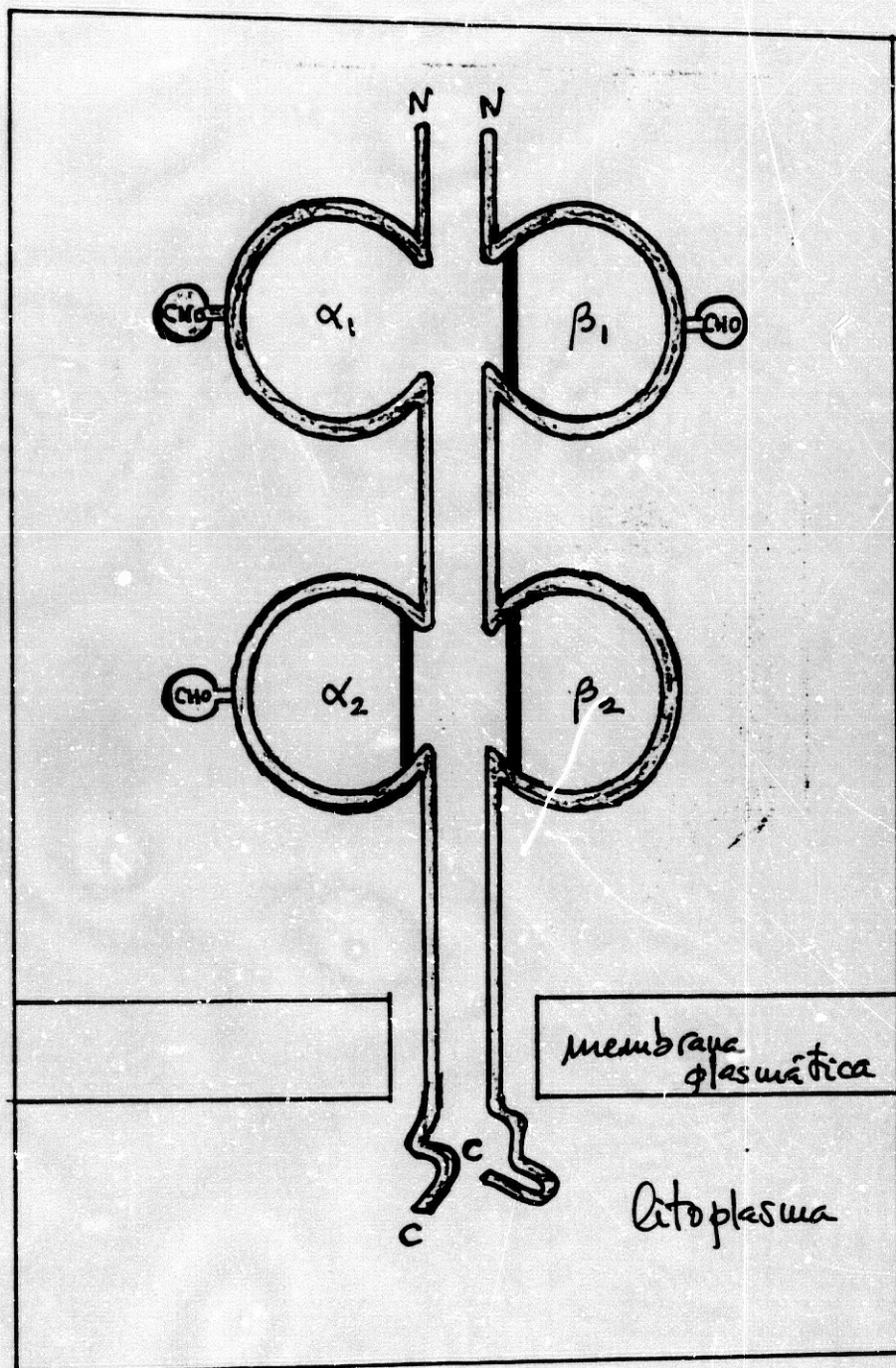


FIGURA 3

ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE II

y líneas homocigotas bien caracterizadas. Los anticuerpos monoclonales, por su especificidad y por tratarse de reactivos homogéneos, han permitido delimitar las distintas moléculas relacionadas con las tres subregiones: DP, DQ, DR. De gran utilidad asimismo, ha sido el empleo de líneas mutantes obtenidas por radiaciones. La selección posterior a la radiación permite disponer de células que sólo expresan una especificidad de antígenos HLA de clase II.

Antígenos HLA-DR

La cadena alfa de las moléculas HLA-DR tiene una secuencia de 229 aminoácidos (Kratzin y cols., 1.983), de los que 191 se localizan fuera de la membrana citoplasmática, 23 en la región hidrofóbica y 15 en la región citoplasmática. La porción extracelular presenta dos dominios, con un solo puente disulfuro en el segundo dominio; dos lugares de glicosilación, uno en el residuo 78 y otro en el 118. El segundo dominio muestra homología con el CH3 de las inmunoglobulinas (Korman y cols., 1.982) (Larhammar y cols., 1.982) (Lee y cols., 1.982).

La cadena beta fué aislada por kratzin y cols., (1.981), y su análisis completo se consiguió con la aplicación de la técnica del DNA recombinante por Long y cols., (1.983). La secuencia de la cadena beta, tiene 237 aminoácidos y dos dominios extracelulares con un puente disulfuro cada uno. La porción transmembrana consta de 22 residuos y la citoplasmática de 16. La molécula solo presenta un lugar de glicosilación en el aminoácido Asn (Asparagina) de la posición 19. En la región amino-terminal existen 91 residuos

que poseen cierta afinidad con los antígenos HLA de clase I. El segundo dominio, comprendido entre los aminoácidos 92-192, se relaciona con el CH3 de las inmunoglobulinas.

La cadena beta es muy polimórfica, a diferencia de la alfa, y en ella reside el determinante antigénico aloespecífico.

Hurley y cols., (1.982, 1.983) describieron que una molécula HLA-DR estaba compuesta por un solo tipo de cadena alfa que puede combinarse con tres cadenas diferentes beta. Shackelford y cols., (1.981), descartaron que las diferencias existentes entre las bandas correspondientes a las cadenas beta de una misma célula, en una electroforésis bidimensional, se debieran a diferentes patrones de glicosilación. Actualmente se piensa que solo se expresan dos cadenas DR-beta en una misma célula (Trowsdale y cols., 1.985).

Groner y cols., (1.983), empleando la electroforésis bidimensional y Nepom y cols., (1.983), con la electroforésis unidimensional, establecieron las relaciones a nivel molecular entre la especificidad DR4 y las D (Dw4, Dw10, Dw13, Dw14 y Dw15) definidas por HTC (células homocigotas) en cultivos mixtos primarios. La especificidad DR4 actúa como supertípica de las especificidades D, que se correlaciona de forma precisa con un determinado patrón de cadenas beta.

Antígenos HLA-DQ

Tosi y cols., (1.978), demostraron por inmunoprecipitación secuencial y empleando aloantisueros que

la molécula DC1 (DQw1) era distinta de la molécula DR1. Corte y cols., 1.981; Schackelford y cols., 1.981, lo confirmaron utilizando Ac.monoclonales.

Giles y cols., (1.983), con el AcMo IVD12, encontraron una molécula específica distinta de DR para el determinante DQw3 (MB3, DC4). Karr y cols., (1.984), descubrieron el mismo hecho para la especificidad DQw2 (MB2, DC3). Estos datos confirman la hipótesis inicial de Duquesnoy en 1.979, que las moléculas con especificidad DQ (MB) representan una serie alélica independiente.

La estructura general de las moléculas DQ, consta de dos cadenas alfa y dos beta que se agrupan en dos dímeros alfa-beta (Giles y cols., 1.983) (Karr y cols., 1.984) (Gotz y cols., 1.983).

Las cadenas alfa del primer dímero, constan de 231 aminoácidos (Gotz y cols., 1.983) (Auffray y cols., 1.982) (Schenning y cols., 1.984). Se diferencian de la cadena alfa de las moléculas DR, no sólo en el número de aminoácidos, sino por ser polimorfa, sobre todo a nivel de su primer dominio, entre los aminoácidos 1-86. El segundo dominio, situado entre los aminoácidos 87 y 180, es parecido al segundo dominio de las moléculas DR alfa y al CH3 de las inmunoglobulinas.

Las diferencias descritas entre las cadenas DQ alfa y DR alfa previenen la formación de híbridos DQ-DR (Benoist y cols., 1.983).

La cadena DQ beta 1, compuesta por 229 amino-

ácidos, es polimorfa fundamentalmente en su primer dominio, situado entre los aminoácidos 52-57, 70-77 y 84-90, y en ella reside el determinante antigénico aloespecífico de la serie DQ (Goyert y cols., 1.982).

Las cadenas alfa 2 del otro dímero DQ, no son polimórficas y junto a las cadenas DQ beta 2, forman la molécula que se ha denominado DQ2 (anteriormente DQX) que se expresa a nivel de la membrana celular junto a la molécula DQ1.

Charron y cols., (1.984) descubrieron la posible unión entre cadenas alfa beta de distintos dímeros, por lo que una cadena alfa se puede unir con una beta de distinto cromosoma (Transasociación), o bien hacerlo con una beta de distinto dímero del mismo cromosoma (Cisasociación).

Antígenos HLA-DP

Las moléculas HLA-DP son las portadoras de los determinantes antigénicos detectados por los linfocitos estimulados en cultivos mixtos secundarios.

Adler y cols., (1.981) Watson y cols., (1.983), las aislaron. El análisis posterior de la región aminoterminal permitió diferenciarlas de las cadenas DQ y DR (Hurley y cols., 1.982), aunque su secuencia completa y su estructura específica, no está tan bien estudiada como las DR y DQ.

Actualmente se describen dos genes DP alfa y dos DP beta que son muy homólogos, y existen algunos datos que afirman que un gen DP alfa y otro DP beta no

son funcionales (Auffray y cols., 1.984) (Gustafsson y cols., 1.984) (Long y cols., 1.984) (Roux-Dosseto y cols., 1.983).

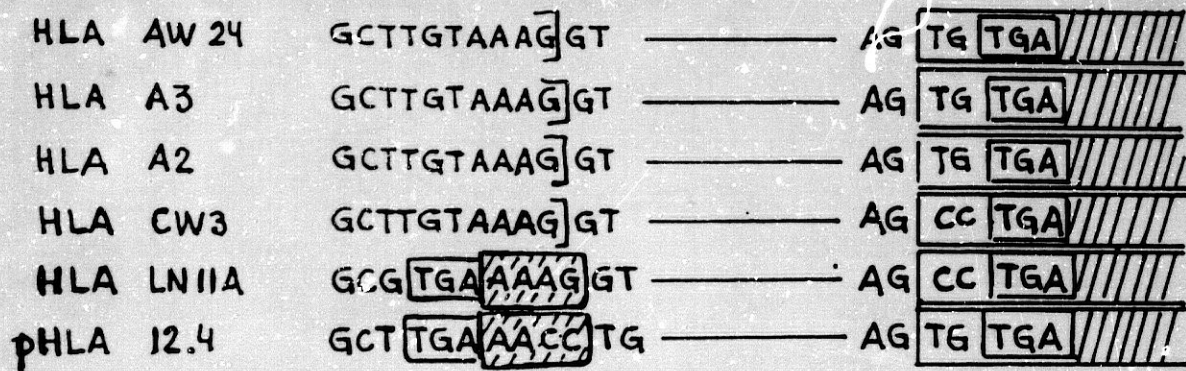
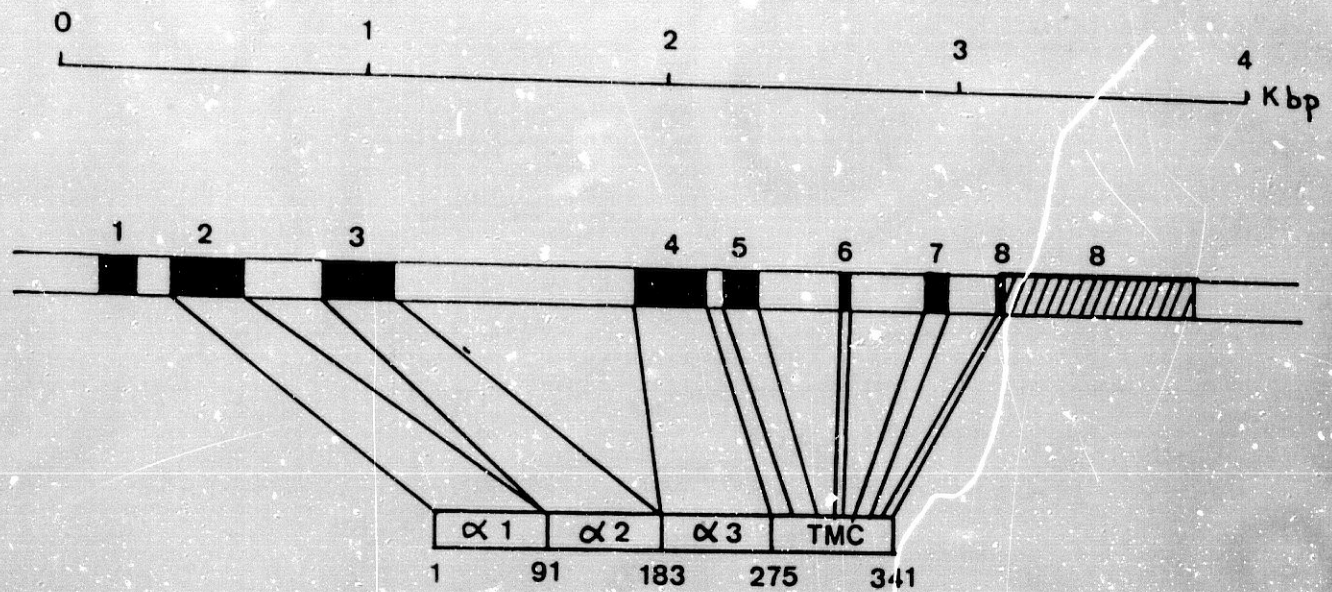
I-2.3 ESTRUCTURA DE LOS GENES HLA

I-2.3-1 GENES HLA DE CLASE I

Un gen de clase I, consta de 8 exones y 7 intrones (Fig. 4). El primer exón tiene 18 nucleótidos no codificantes seguido de una zona que codifica para un péptido, denominado líder, constituido por 24 aa hidrofóbicos y que es el responsable de la inserción de la cadena pesada en la membrana citoplasmática. Los exones segundo, tercero y cuarto presentan 270 nucleótidos cada uno. El segundo y tercero son los más polimorfos, ya que codifican para el primer y segundo dominio respectivamente de la cadena pesada. El cuarto es el más conservado y codifica para el tercer dominio, que muestra homología con el dominio CH3 de las inmunoglobulinas.

El quinto exón, de 122 nucleótidos codifica para el fragmento transmembrana. Los exones sexto y séptimo son pequeños, de 11 y 15 codones respectivamente. La región que codifica se sitúa en el citoplasma con residuos de cisteína y serina, que son lugares de fosforilación celular.

El octavo exón es el más largo de todos, con 400 residuos, pero solo contribuye con un pequeño fragmento, a completar la secuencia de aa en la porción carboxi-terminal de la cadena pesada. Una pequeña variación en la estructura de los genes de clase I,



HLA B.7
cDNA

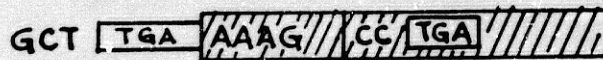


FIGURA 4

ESTRUCTURA DE LOS GENES HLA DE CLASE I

consiste en que algunos genes como el que codifica para el antígeno HLA B7 presenta el último codón al final del séptimo exón, mientras que en la mayoría, la translación concluye con los primeros nucleótidos del exón octavo (Srivastava y cols., 1.985).

Existe un alto porcentaje de homología entre las secuencias de bases de los exones de los genes HLA de clase I que crece progresivamente del exón I al IV.

Los exones se pueden dividir en regiones variables y regiones homólogas (Sood y cols., 1.981). El 80 % de los cambios de bases en las regiones variables modifican la secuencia de aa de la cadena pesada, mientras que en las regiones homólogas, sólo el 35 % de los cambios se traducen en alteración en las posiciones de los aa, siendo la frecuencia de mutaciones igual para las dos zonas del exón.

A nivel de los intrones se han descrito zonas de "splicing" sobre las que se efectúa el plegamiento del RNA primordial durante la síntesis de RNAm. Las secuencias de splicing, sirven para evitar la traslación de fragmentos de DNA situados en los intrones. Se piensa que los genes de histocompatibilidad tienen sus señales de splicing propias (Langford, Gallowitz, 1.983) (Pikielny y cols., 1.983).

Las diferencias encontradas entre los genes de clase I, se atribuyen más que a procesos de mutación puntuales, a mecanismos de conversión génica. La conversión génica consiste en que un determinado gen da origen a otro que se sitúa en un locus distinto,

manteniendo constante una región extensa en la secuencia de bases, que sirve como marcador del proceso. Las divergencias encontradas entre los diferentes genes de clase I, se localizan en una zona determinada (Weiss y cols., 1.983) (Lopez de Castro y cols., 1982).

Tanto en genes H-2 como HLA de clase I, tienen una señal transcripcional de gran importancia denominada CAT box, formada por las bases CCAAT de la región 5' y se relaciona con el inicio de la secuencia del RNAm. El gen HLA-Cw, es una excepción y modifica la secuencia a CCGGT.

También se han descrito promotores internos para los genes HLA al igual que en las inmunoglobulinas. La mayoría de las secuencias reguladoras de la expresión estudiadas, han mostrado un actividad preferente en algunos tipos celulares y a menudo se correlacionan con el estado de diferenciación celular. Dado que los genes de clase I se expresan en gran número de tipos celulares diferentes, no sería sorprendente que tuvieran un número de secuencias reguladoras adaptadas a las distintas extirpes celulares (Halloran y cols., 1.986).

Existen elementos de control adicionales en los genes del CMH, como lo demuestra la modulación de la expresión de las moléculas HLA por los diferentes tipos de interferón alfa, beta y gamma (Basham y cols., 1.982) (Fellous y cols., 1.982) (Wallach y cols., 1.982).

De acuerdo con los trabajos de Srivastava y cols., 1.985, se pueden identificar más de 40 genes

HLA de clase I, la mayoría de los cuales se encuentran en locus similares a los Qa y TL murinos.

I-2.3-2 GENES HLA DE CLASE II

Existen tres subregiones: DP, DQ y DR, que codifican para las moléculas de clase II, a nivel del brazo corto del cromosoma 6. Estas moléculas se componen de una cadena alfa y una cadena beta, existiendo para cada subregión genes alfa y genes beta (Lee y cols., 1.982) (Spielman y cols., 1.984) (Inoko y cols., 1.984).

En general, estos genes de clase II, constan de 5 exones y 4 intrones (Fig. 5). El primer exón está localizado en la porción 5' y muestra una zona que no transcribe y otra que codifica para el péptido líder. Los exones segundo y tercero codifican para los dominios primero y segundo, situados fuera de la célula; el cuarto codifica para el péptido de conexión hidrofóbica, la región hidrofóbica transmembrana y el área intracitoplasmática. Posee además nucleótidos en la porción 3' que no se transcriben y el quinto exón, en la porción 3' del gen, que tampoco se transcribe.

* Genes que codifican para las cadenas alfa

En los genes DR-alfa se han secuenciado de forma independiente varias copias de cDNA HLA-DR alfa y de clones genómicos (Larhammar y cols., 1.982).

Los genes DQ-alfa por el contrario muestran un gran polimorfismo (Trowsdale y cols., 1.983) (Auffray

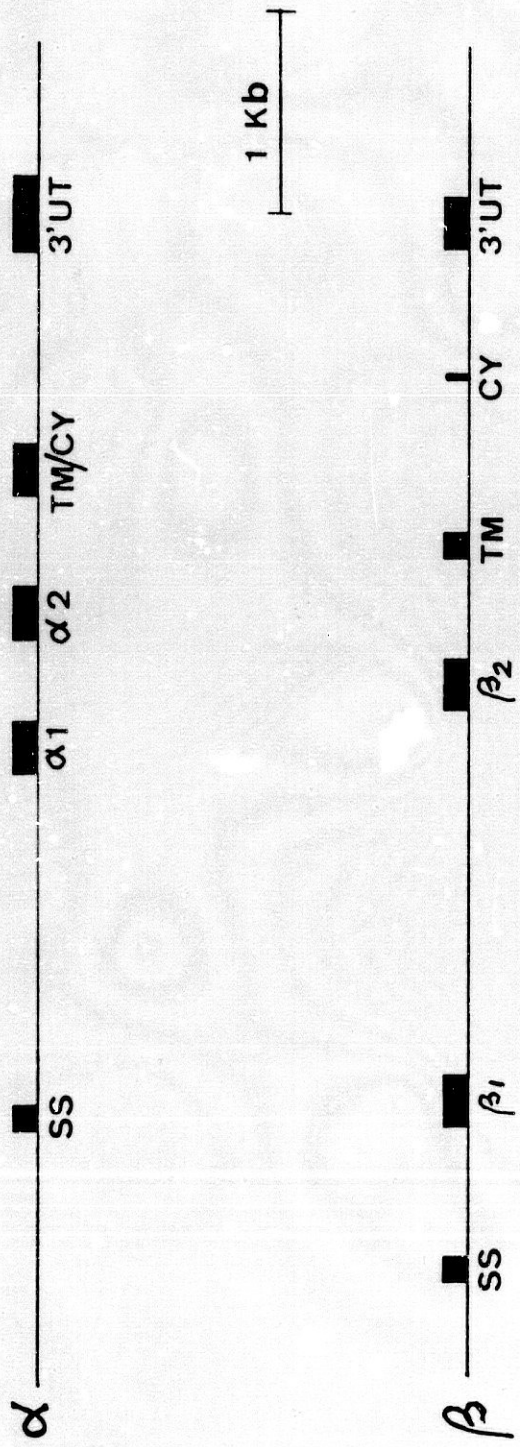


FIGURA 5

ESTRUCTURA DE LOS GENES HLA DE CLASE II

y cols., 1.984) (Chang y cols., 1.983), lo que conlleva un aumento de las variaciones en las moléculas DQ, al combinarse cadenas alfa con beta también polimórficas. Este polimorfismo se ha relacionado con la resistencia a determinados agentes patógenos (Bodmer, 1.972), así como con la diabetes insulino-dependiente (Spielman y cols., 1.984).

Las variaciones observadas entre los genes de las cadenas DQw1-alfa y DQw2-alfa, se centran en la región que codifica para un fragmento de 35 aa entre las posiciones 45 y 80 y se considera esta región, en las cadenas I-A alfa del ratón, y en las DQ-alfa humanas, como las portadoras de los determinantes antigénicos aloespecíficos (Benoist y cols., 1.983).

Existe un desequilibrio de unión entre los alelos de los locus DQ-alfa y DR-beta, demostrado mediante la técnica de Southern-Blot (Trowsdale y cols., 1.983) (Auffray y cols., 1.984).

El gen DQ2 (DQX) es menos polimórfico que el DQ-alfa1, pero muestra con ellos las semejanzas necesarias para aparecer siempre junto a sus variantes en los análisis con técnica de Southern-Blot. El hecho que no muestre desequilibrio de unión con DQ, DR y DP significa que los dos puntos de recombinación génica en la región D se sitúan entre los genes DP-DQ2 y entre los DQ2 - DQ1 - DR (Bodmer y Bodmer, 1.984). El gen DQ-alfa2 se encuentra asociado con el DQ-beta2, lo que permite situarlos juntos sin punto de recombinación entre ellos. Los genes DQ-alfa2 y DQ-beta2 se expresan junto a los genes DQ1.

Los genes DP-alfa son menos polimorficos que los DQ-alfa. El número de variaciones es de 8, tres de las cuales se localizan en el exón que codifica para el dominio alfa 1, otras tres para el dominio alfa 2 y dos silentes. Se han descrito clones genómicos procedentes de cósmidos que incluyen dos genes, DP-alfa 1 y DP-alfa 2 ó SX-alfa, y junto a estos dos genes se han descrito dos genes DP-beta (Okada y cols., 1.985) (Larhammar y cols., 1.984) (Trowsdale y cols., 1.984). Los genes DP-alfa 2 y DP-beta 2 de algunos haplotipos, presentan mutaciones o defectos en los lugares de "splicing" (Kappes y cols., 1.984) (Serenius y cols., 1.984). Por lo que se piensa que son los genes DP-alfa 1 y DP-beta 1 los que codifican para la molécula DP expresada en la membrana (Kelly, Trowsdale, 1.985) (Hurley y cols., 1.982) (Trowsdale y cols., 1.985) (Berget, 1.984).

El gen DZ-alfa, fué descrito por Spielman y cols., (1.984). En 1.985 (Kelly, Trowsdale, 1.985), se estableció su secuencia de nucleótidos, es parecido al gen DR-alfa. Se ignora aún si el gen DZ-alfa es funcional. Se han obtenido clones similares al DZ-alfa que se han denominado DO-alfa, siendo probablemente alelos del mismo locus (Inoko y cols., 1.984).

* Genes que codifican para las cadenas beta

Genes DR-beta.

Los trabajos de Okada y cols., (1.985), con los cósmidos obtenidos de la línea celular Priess de tipaje (DR4,4, DQw3, W3 y DP3,4), han demostrado que existe por haplotipo cuatro genes DR-beta y un

gen DR-alfa, su ordenamiento se realiza: primero el gen DR-beta 1 que codifica para la especificidad DR, segundo el gen DR-beta 2 que no se expresa (pseudogen), tercero el gen DR-beta 3 que codifica la especificidad DRW₅₂, en cuarto lugar el gen DR-beta 4 que codifica la especificidad DRW₅₃, y en último lugar el gen DR - alfa; esta disposición es similar a la descrita en la región murina IE (Okada y cols., 1.985) (Larhammar y cols., 1.985).

Genes DQ-beta.

En la región DQ se han descrito dos locus que codifican para dos cadenas beta. Al segundo se le denomina DQ-beta 2 y se asocia al DQ-alfa 2 para constituir la molécula DQ2 (DQX). El gen DQ-beta 1, carece de un exon para la región citoplasmática y presenta una orientación inversa a los otros genes beta (DR y DP) (Okada y cols., 1.985); es polimórfica en su secuencia codificante y con enzimas de restricción se han descrito fragmentos (RFLP) característicos de estos genes (Auffray y cols., 1.983) (Spielman y cols., 1.984) (Cohen y cols., 1.984).

En el gen DQ-beta 2, su región beta 1 es normal y muestra un alto grado de homología con el dominio DQ-beta 1 (Okada y cols., 1.985). Las diferencias se encuentran entre los aa 58 y 64, y existe una delección de un aa en la posición relativa a DQ-beta. El promotor y la secuencia señal así como el resto de los exones se presentan intactos (Spielman y cols., 1.984) (Cohen y cols., 1.984).

Genes DP-beta.

La región DP consta de 100 Kb (Okada y cols., 1.985). En esta región se han descrito dos pares de genes alfa y beta. Los genes DP-beta presentan estructura de seis exones, similar a la de otros genes que codifican cadenas beta de clase II (Kelly, Trowsdale, 1.985).

El estudio comparativo de los genes DP-beta 1, muestra un polimorfismo limitado si se compara con los genes DQ-alfa, DQ-beta y DR-beta. Las diferencias entre los distintos alelos están centradas en el dominio beta 1, entre los aa 50 y 90, lo que sugiere que existe un predominio por parte de los genes DP-beta en la constitución de las especificidades de las moléculas DP (Roux-Dosseto y cols., 1.983) (Gustafsson y cols., 1.984).

El segundo grupo de genes DP-beta, denominado DP-beta 2 ó SX-beta, se asocia con el correspondiente DP-alfa 2 ó SX-alfa. Este grupo de genes no se expresan, ya que pertenecen al grupo de los pseudogenes (Kappes y cols., 1.984) (Serenius y cols., 1.984). El gen SX-beta presenta una mutación en el dominio beta 2, en la posición 100, que da lugar a un codón de "stop" que impide la transcripción de 18 aa. El dominio beta 1 del gen SX-beta, no tiene ningún defecto. El gen SX-beta presenta un 77 % de homología con el DP-beta.

Los genes de clase II tienen una estructura similar a los genes de clase I, con alternancia de exones y de intrones. Exceptuando los genes DQ-beta y DP-beta donde los exones beta 1 y beta 2 están separados por un intrón

de 2 Kb y 4 Kb respectivamente, todos los demás intrones de los genes de clase II son pequeños. Los genes beta presentan al menos un intrón extra en la región que codifica para el péptido de conexión de la zona C-terminal y en esto se parecen a los genes de las cadenas pesadas de los antígenos de clase I.

La secuenciación de los intrones puede contribuir a esclarecer el papel que estas regiones juegan en la regulación de la expresión de los genes (Kelly, Trowsdale, 1.985) (Young, Trowsdale, 1.985).

La secuenciación de varios genes humanos de clase II y de ratón, ha permitido su comparación a nivel de la región promotora con la idea de identificar y localizar zonas reguladoras. Se han definido dos regiones, denominadas A y B con gran homología entre los diferentes genes para clase II, con la particularidad de que se han observado secuencias parecidas en los genes de las inmunoglobulinas (Parslow y cols., 1.984) (Falkner, Zachau, 1.984), de la histona H2B (Harvey y cols., 1.982), y H2A (Grosschedl, Birnstiel, 1.980), y en algunos genes de *Drosophila* y *Escherichia Coli* (Kelly, Trowsdale, 1.985).

I-2.4 APLICACIONES DE LA TECNICA DE SOUTHERN BLOT AL ESTUDIO DE LOS GENES HLA

La técnica de Southern Blot permite un estudio rápido a nivel de poblaciones, del polimorfismo de los genes de histocompatibilidad. El objetivo de su empleo es correlacionar un determinado patrón de bandas correspondientes a fragmentos de DNA, con una especificidad definida serológicamente. Los proble-

mas que plantea vienen condicionados por las frecuentes reacciones cruzadas entre genes de diferentes locus con una determinada sonda y la complejidad que supone la interpretación de los resultados en individuos heterocigotos (Southern, 1.975).

Las reacciones cruzadas se reducen cambiando las condiciones de la hibridación, sobre todo cuando se trata de sondas de clase II (Strachan y cols., 1.984) (Sodoyer y cols., 1.984); en cambio, con las sondas de clase I, este problema persiste por la gran homología existente entre sus distintos locus (Gustafsson y cols., 1.984) (Kappes y cols., 1.984). Con sondas de menor tamaño que hibridan de forma más específica, se obtienen patrones más simples, aunque se pierden regiones intra ó intergénicas donde pueden residir puntos de corte para los enzimas de restricción, causa del polimorfismo (Grumet y cols., 1.983).

Las dificultades planteadas por individuos heterocigotos, han obligado a realizar trabajos con líneas celulares establecidas de individuos homocigotos para HLA (Wake y cols., 1.982) (Auffray y cols., 1.983) (Trowsdale y cols., 1.983) (Spielman y cols., 1.984) (Roux-Dosseto y cols., 1.983) (Paulsen y cols., 1.984) (Anderson y cols., 1.984). Otra alternativa para resolver este problema es el estudio de familias, donde se puede seguir en los hijos la segregación de un determinado patrón de fragmentos de restricción relacionados con un haplotipo (Ascanio y cols., 1.982) (Cann y cols., 1.983) (Cohen y cols., 1.984) (Dansset, Cohen, 1.984). En un grupo de 22 familias (Dansset, Cohen, 1.984), seleccionadas de forma que en los

hijos de cada pareja, estuvieran representadas tres de las cuatro combinaciones posibles de haplotipos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

1) Genes de clase I.- El número de bandas detectadas por haplotipo varía de 15 a 25 según la enzima de restricción empleada. Varias bandas pueden pertenecer a un sólo gen ó a la inversa. Se definen como alogenotopos a las bandas relacionadas con una determinada especificidad o haplotipo (Sood y cols., 1.981).

El análisis de la distribución de alogenotopos entre los haplotipos, muestra la existencia de grupos constituidos por fragmentos que coinciden en el mismo haplotipo. El 63 % de los alogenotopos de clase I se correlacionan con los alelos HLA-A y sólo un 13 % con los HLA-B y un 5 % con los HLA-C (Larhammar y cols., 1.982).

Este hecho contrasta con el alto grado de polimorfismo detectado por serología para la serie B. La mayoría de los alogenotopos relacionados con los alelos B y C están representados por una sola banda, mientras que los alelos A se correlacionan con grupos de alogenotopos formados por varias bandas. Esta discrepancia se puede explicar por el hecho de que los genes B y C están flanqueados por menos copias que el A, o bien porque las regiones A y B-C se encuentran afectadas por mecanismos diferentes de variación alélica (Kreiss y cols., 1.984).

Algunos alogenotopos se correlacionan con especificidades supertípicas tales como A1-A11, A3-A11,