

A23-A24 y no se ha encontrado ningún aloenotopo en este estudio que se correlacione con la reacción cruzada A2-A28. Sin embargo un aloenotopo se relaciona con dos especificidades no reactivas cruzadas A3-A9 (Dausset, Cohen, 1.984). Los aloenotopos que no se pueden relacionar con ninguna especificidad serológica, probablemente se correspondan con los genes de clase I similares a los Qa y T1 murinos (Dausset, Cohen, 1.984).

2) Genes de clase II.- Se estudian con tres tipos de sondas de clNA para genes de clase II: DQ-alfa, DQ-beta y DR-beta. Los patrones de hibridación para la sonda DQ-alfa son simples (2-6 bandas) (Dausset, Cohen, 1.984), mientras que las sondas beta muestran mayor complejidad (10-20 bandas) (Dausset, Cohen, 1.984).

El análisis de correlación permite distinguir numerosos grupos de aloenotopos, cada uno de ellos constituido como mínimo por dos fragmentos. La correlación positiva refleja desequilibrio de unión, mientras que la negativa significa alelismo en ciertas regiones genómicas. Los aloenotopos para la sonda DQ-alfa forman dos series alélicas; la primera, formada por tres grupos, se asocia con el locus DQ-alfa, mientras que la segunda, de dos grupos, está relacionada con el locus DQ-alfa 2. Para la sonda DQ-beta se han descrito otras dos series alélicas que se asocian con los locus DQ-beta y DQ-beta 2. La sonda DR-beta define seis grupos de aloenotopos (Dausset, Cohen, 1.984).

Otro tipo de análisis de los grupos de

alogenotopos consiste en mezclar los fragmentos detectados por las tres sondas después de su asignación a los genes DQ o DR. Se observaron 16 grupos, 14 de los mismos se pudieron correlacionar de forma clara con varias o con una sola especificidad DR (Cohen y cols., 1.984).

I-2.5 DISTRIBUCION TISULAR DE LOS ANTIGENOS HLA

I-2.5-1 DISTRIBUCION TISULAR DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE I

La mayoría de las células del organismo expresan antígenos HLA de clase I. No se han detectado en las neuronas del sistema nervioso central, en el endotelio corneal ni en diversas estructuras glandulares como las localizadas en la porción exocrina del pancreas, las células acinares de la parótida y las glándulas de Brunner en el duodeno. Las vellosidades trofoblásticas también carecen de la expresión de los antígenos HLA de clase I (Daar y cols., 1.984).

En otros tejidos su expresión es débil como en la mucosa gástrica, el músculo esquelético, el miocardio y en las células endocrinas del tiroides, paratiroides e islotes de Langerhans. Tabla 4.

En los hepatocitos (Fleming y cols., 1.981) (Barbatis y cols., 1.981) y espermatozoides (Halin y cols., 1.974) (Law, Bodmer, 1.978), la expresión de los antígenos HLA de clase I está sometida a discusión.

T A B L A 4

DISTRIBUCION TISULAR NORMAL DE LAS MOLECULAS HLA CLASE I

TEJIDO	EXPRESION HLA CLASE I	TEJIDO	EXPRESION HLA CLASE I
<u>SISTEMA ENDOCRINO</u>		<u>SISTEMA UROGENITAL</u>	
Tiroides	+b	Glomérulo renal	++
Paratiroides	+	Túbulo renal	++
Pituitaria	+	Epitelio de:	
Islotes de Langerhans	+	Uréter	++
Suprarrenales:		Vejiga	++
Corteza	++a	Próstata	++
Médula	++	Uretra	++
<u>TRACTO GASTROINTESTINAL</u>		Testículos:	
Epitelio de		Espermatozoides	+
Lengua	++	Células de Leydig y	
Esófago	++c	Sertoli	+
Estómago:		Epidídimo:	
Fundus	+	Epitelio	+
Antro	+	Espermatozoides	++
Duodeno	++	<u>MISCELANEA</u>	
Glándulas de Brunner	+/-d	Epitelio mamario:	
Ileon	++	Ductal	++
Apéndice	++	Glandular	++
Colon	++	Páncreas:	
Recto	++	Porción exocrina	-
Ampolla rectal	++	Epitelio ductal	++
Hígado:		Parótida:	
Células sinusoidales	++	Epitelio acinar	-
Hepatocitos	+/-	Epitelio ductal	++
Epitelio biliar	++	Músculo:	
<u>SISTEMA CARDIO-RESPIRATORIO</u>		Esquelético	+e
Epiglotis	++	Liso	+
Tráquea	++	Córnea:	
Epitelio amigdalina	++	Epitelio escamoso	++
Pulmón	++	Endotelio, m. Descemet	
Corazón:		y lamina propia	-
Miocardio	+	Células de Langerhans	
Discos intercalares	++	y células dendríticas	
Endotelio:		intersticiales	++
Capilares	++	Linfáticos	++
Grandes vasos	++	Fibroblastos	++
<u>SISTEMA NERVIOSO</u>		Placenta (v. trofoblasto)	-
Periférico	++	Epidermis	+
Central:			
Neuronas	-		
Duramadre	++		

a(++)=fuertemente marcadas; b(+)= levemente marcadas
 c =Capa basal o mas profunda positiva; d(-)=no marcadas
 e(+)=muy levemente marcadas

I-2.5-2 DISTRIBUCION TISULAR DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE II

La expresión de los antígenos HLA de clase II se describió en un principio como restringida a las células relacionadas con el sistema inmune: Linfocitos B y monocitos (Kissmeyer-Nielsen, 1.975), linfocitos T activados (Schirmacher, Festenstein, 1.975), células epidérmicas de Langerhans que actúan como presentadoras de antígenos (Klareskog y cols., 1.977). También se expresan en diferentes estadios de diferenciación de precursores hematopoyéticos (Winchester, Kunkel, 1.979).

Posteriormente se ha detectado la expresión de los antígenos HLA de clase II en células de origen no linfoide como las endoteliales (Hirschberg y cols., 1.979) y varios tipos de células epiteliales (Wiman y cols., 1.978) entre las que se encuentran células del duodeno, de los glomerulos y túbulos renales, de la uretra y del epidídimo (Nixon y cols., 1.982) (Natali y cols., 1.981) (Daar y cols., 1.984). Tabla 5.

I-2.6 FUNCION DE LOS ANTIGENOS HLA

I-2.6-1 FENOMENO DE RESTRICCION DEL CMH SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

Los efectos mediados por los antígenos de clase I y II son de naturaleza inmunológica, y tienen como denominador común la estimulación de linfocitos T (Bodmer y Bodmer, 1.978). Esto se ha puesto de manifiesto por una amplia gama de ensayos:

T A B L A 5

DISTRIBUCION TISULAR NORMAL DE LAS MOLECULAS HLA II

TEJIDO	EXPRESION HLA CLASE II	TEJIDO	EXPRESION HLA CLASE II
<u>SISTEMA ENDOCRINO</u>		<u>SISTEMA UROGENITAL</u>	
Tiroides	-a	Glomérulo renal	++
Paratiroides	-	Túbulo renal	++/-/+
Pituitaria	-	Epitelio de:	
Islotes de Langerhans	-	Uréter	-
Suprarrenales:		Vejiga	-
Corteza	-	Próstata	-
Médula	-	Uretra	++
<u>TRACTO GASTROINTESTINAL</u>		Testículos:	
Epitelio de:		Espermatozoides	-
Lengua	+b,c	Células de Leydig y Sertoli	-
Esófago	-	Epidídimo:	
Estómago:		Epitelio	++/-
Fundus	-	Espermatozoides	-
Antro	-	<u>MISCELANEA</u>	
Duodeno	++d,e	Epitelio mamario:	
Glándulas de Brunner	-	Ductal	++
Ileon	++e	Glandular	++
Apéndice	++e	Páncreas:	
Colon	-	Porción exocrina	-
Recto	-	Epitelio ductal	-
Vesícula	NTf	Parótida:	
Hígado:		Epitelio acinar	-
Células sinusoidales	++	Epitelio ductal	-
Hepatocitos	-	Músculo:	
Epitelio biliar	-/+g	Esquelético	-
<u>SISTEMA CARDIO-RESPIRATORIO</u>		Liso	-
Epiglotis	++c	Córnea:	
Traquea	++	Epitelio escamoso	-
Tonsila	++	Endotelio, m. Descemet y lámina propia	-
Pulmón	NT	Células de Langerhans y células dendríticas intersticiales	++
Corazón:		Linfáticos	++
Miocardio	-	Fibroblastos	-
Discos intercalares	-	Placenta (v.trofoblasto)	-
Endotelio:		Epidermis	-
Capilares	++h		
Grandes vasos	+/-/+		
<u>SISTEMA NERVIOSO</u>			
Periférico	-		
Central:			
Neuronas	-		
Duramadre	++		

a(-)=no marcadas; b(*)=levemente marcadas;
 c Capa basal o mas profunda positiva; d(++)=fuertemente marcadas
 e Células profundas de las criptas de Lieberkühn, negativas
 fNT=no testado; g(+)=muy levemente marcadas;
 h Excepto en cerebro y placenta y posiblemente en testículo.

cultivo mixto linfocitario (Dupont y cols., 1.980), reacción del injerto contra el huesped (Simonsen, 1.962), linfocitotoxicidad mediada por células (Gordon y cols., 1.975), hipersensibilidad retardada (Vadas, Greene, 1.981) y reacción frente al injerto (Hurme y cols., 1.978). Todos estos ensayos requieren contacto entre linfocitos alogénicos, situación que no ocurre de forma natural en vertebrados superiores.

La verdadera función de las moléculas del CMH, es servir como marcador de lo propio en el reconocimiento de lo extraño por los linfocitos T. Las moléculas de clase I, son marcadores de lo propio para los linfocitos T citotóxicos, de forma que sólo pueden actuar sobre células diana que posean los mismos antígenos de clase I. Este fenómeno de restricción, se descubrió simultáneamente por Zinkernagel y Doherty (1.974) para células infectadas con virus, y por Shearer y cols. (1.975) para células singénicas modificadas con trinitrofenil (TNP).

Las moléculas de clase II, son marcadores de lo propio para las células T reguladoras y condicionan su interacción con los linfocitos B (Katz y cols., 1.973) y con las células presentadoras de antígenos (APC) (Rosenthal, Shevach, 1.973) (Yano y cols., 1.977). Sólo habrá producción de anticuerpos ó estimulación linfocitaria, si las células presentadoras de antígenos ó los linfocitos B, muestran identidad en la expresión de los antígenos de clase II con los linfocitos T reguladores.

I-2.6-1.1 Bases moleculares del fenómeno de restricción por CMH

En el año 1.974, el fenómeno de restricción de las funciones inmunes por el CMH, había sido perfectamente descrito y delimitado aunque no estaba clara su interpretación (Katz y cols., 1.973) (Rosenthal, Shevach, 1.973) (Yano y cols., 1.977).

La primera hipótesis, suponía que los linfocitos T reaccionaban mediante un receptor específico para el antígeno y a través de un enlace establecido con las moléculas del CMH de los tipos celulares implicados que tenían que ser idénticas a las de los linfocitos T. De esta forma entre las moléculas del CMH se formarían un complejo similar a los dímeros o tetrámeros de las enzimas. Ambos tipos de enlaces se realizarían simultáneamente para producir la estimulación de los linfocitos T. Este modelo recibió la denominación de "interacción entre iguales" (like-like) o de proximidad, ya que dentro de las experiencias de citotoxicidad mediadas por linfocitos T, proponía la necesidad de una asociación muy estrecha entre el linfocito T y la célula diana para que la lisis ocurriera, posiblemente porque el mecanismo de lisis estaba mediado por las moléculas de clase I del CMH (Schwartz, 1.984).

Frente a esta primera teoría, Zinkernagel y Doherty (1.974) consideraban que la lisis por los linfocitos T de las células diana infectadas por virus, necesitaba de un receptor que no reconocía el antígeno viral, sino a las moléculas de clase I modificadas por el virus. Este modelo recibió la

denominación de "alteración de los propio".

De forma alternativa, Schwartz (1.984) propuso que la molécula de clase I codificada por el CMH y las proteínas virales expresadas en la membrana celular, interaccionan para formar un complejo, que es reconocido como una sola entidad extraña por el linfocito T. El complejo recibió el nombre de determinante neoantigénico (NAD) ó determinante antigénico complejo (CAD). El fenómeno de restricción por el CMH, se explicaba como un proceso de reconocimiento simultáneo de un antígeno y de las moléculas de clase I del CMH por un receptor único de la célula T.

Se demostró que las moléculas codificadas por el CMH de la célula diana ó de la célula presentadora de antígeno, intervienen en la constitución del determinante antigénico reconocido por los linfocitos T, y que las moléculas del CMH de los linfocitos T no intervienen como elementos de enlace con las células diana (Paul y cols., 1.977).

Si quedaba alguna duda sobre la existencia de un receptor único y específico para el complejo antígeno-moléculas singénicas del CMH, el desarrollo de las técnicas de clonación de linfocitos T, ha venido a confirmar esta teoría (Sredni, Schwartz, 1.981).

Con tres grupos de experiencias se estableció, de forma definitiva, que las moléculas de clase I son elementos de restricción reconocidas por linfocitos T citotóxicos:

* Koszinowski y Ertl (1.975), descubrieron que los sueros anti-H2 inhibían la citotoxicidad mediada por linfocitos T frente a células infectadas por virus.

* Zinkernagel (1.976), empleó dos cepas mutantes en cuanto a la expresión de la molécula de clase I K^b . Los linfocitos T citotóxicos dirigidos contra la molécula K^b asociada con antígenos virales, no lisaban células mutantes y a la inversa. De esta forma la molécula K^b quedaba definida como el elemento de restricción en el mecanismo de reconocimiento de las células diana por los linfocitos T citotóxicos. Las modificaciones en su estructura alteraban el proceso de reconocimiento.

* Forman y cols. (1.983), mediante tecnología de DNA recombinante, transfectaron el gen codificante de la molécula H-2L^d a células infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Comprobaron que la restricción de la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos dependía de la molécula de clase I codificada por el gen transfectado.

Las moléculas de clase II son los elementos de restricción reconocidos por los linfocitos T cooperadores sinérgicos. La confirmación de esta función se ha llevado a cabo con:

* Experiencias de inhibición de la proliferación de los linfocitos T cooperadores, cuando se tratan células presentadoras de antígeno con sueros anti-Ia (McDougal, Cort, 1.978).

* Cuando se realizan ensayos con cepas mutantes, las modificaciones en la estructura de los antígenos de clase II, afectan a la especificidad de reconocimiento del complejo antigénico por parte de los linfocitos T cooperadores (Kimoto y cols., 1.982).

I-2.6-1.2 Modelo de restricción por el CMH de las funciones de los linfocitos T

* Interacción entre las moléculas del CMH y las moléculas extrañas para constituir el determinante antigénico.

Si las moléculas codificadas por el CMH y las extrañas, se reconocen conjuntamente por los linfocitos T, es de suponer que entre ellas se establezca algún tipo de unión (Rock, Benacerraf, 1.984). Otra posibilidad es que la molécula extraña al asociarse con los antígenos del CMH, induzca cambios que originen nuevos determinantes antigénicos, reconocidos como alogénicos por los linfocitos T (Zinkernagel, Doherty, 1.974).

Heber-Katz y cols. (1.975) consideran que las moléculas antigénicas se concentran en la membrana de la célula presentadora, mediante un enlace establecido por las moléculas del CMH con el receptor de las células T. También se debe considerar la posibilidad de que un mismo receptor de la célula T, lleva a cabo un reconocimiento dual y simultáneo de la molécula del CMH y del antígeno nominal (Pincus y cols., 1.983).

* Receptor de las células T.

El empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra clones de células T humanas, ha permitido la caracterización del receptor específico (Ti) para la asociación antígeno-molécula del CMH (Meuer y cols., 1.982). Este receptor está constituido por dos cadenas, alfa y beta de 51 y 43 Kd respectivamente, asociadas a la molécula T3 constituida por dos péptidos de 20 y 25 Kd y expresada en todas las células T maduras. Su estructura apoya la hipótesis del reconocimiento simultáneo de las moléculas del CMH y del antígeno nominal (Meuer y cols., 1.983).

Los marcadores de subpoblaciones de linfocitos T4 y T8, contribuyen al enlace con las moléculas del CMH. El marcador de las células T cooperadoras (T4), de peso molecular 48 Kd (Reinherz y cols., 1.979), establece algún tipo de unión con las moléculas de clase II (Biddison y cols., 1.982), probablemente en sus regiones monomórficas. Por el contrario el marcador de linfocitos T citotóxicos/supresores (T8), formado por dos péptidos de peso molecular 34-46 Kd (Reinherz y cols., 1.980) se asocia con las moléculas de clase I (Meuer y cols., 1.982).

* Integración de los mecanismos reguladores y efectores de la respuesta inmune.

Los linfocitos T helper desarrollan una función de regulación de la respuesta inmune, de ellos depende la inducción de la producción de anticuerpos o de los mecanismos de citotoxicidad específicos. La interacción, restringida por las moléculas de

clase II entre los linfocitos T cooperadores y las células presentadoras de antígenos, tiene como resultado la producción por parte de éstas de Il-1 (Interleuquina-1) (Rosenstreich y cols., 1.976), que actúa sobre los linfocitos T cooperadores (Gillis, Mizel, 1.981) y los induce a sintetizar Il-2 (Smith y cols., 1.980). La Il-2 estimula la proliferación de los propios linfocitos T cooperadores (Watson, Mochizuti, 1.980) y actúa sobre los linfocitos T citotóxicos previamente sensibilizados, capacitándolos para mediar la lisis de la célula diana (Shaw y cols., 1.980) (Fig.10).

Los linfocitos T cooperadores también interactúan con los linfocitos B, a través del antígeno nominal y de las moléculas de clase II, comportándose los linfocitos B como células presentadoras de antígenos. La interacción linfocito-T cooperador-linfocito B, condiciona el isotipo y el idiotipo de las inmunoglobulinas, sintetizadas por los linfocitos B (Asano y cols., 1.982).

I-2.6-1.3 Origen del fenómeno de restricción por el CMH

En el timo existen células radioresistentes que expresan antígenos del CMH de clase I y II, encargadas de llevar a cabo el aprendizaje de las células T para distinguir lo propio de lo extraño (Von Boehmer y cols., 1.975) (Katz, 1.977).

La restricción por el CMH, es una característica adquirida de los linfocitos T, determinada por su diferenciación en el timo en ausencia del

antígeno. Este proceso ontológico, sitúa al repertorio de células T, en una situación que cuando se introduce el antígeno, sólo los clones específicos para ese antígeno, en asociación con las moléculas del CMH reconocidas como propias, se expanden (Pfizenmaier y cols., 1.976) (Zinkernagel, 1.976) (Bevan, 1.977) (Zinkernagel y cols., 1.978) (Zinkernagel y cols., 1.978) (Zinkernagel y cols., 1.978).

I-2.6-2 ALOREACTIVIDAD

Diversas experiencias realizadas en los albores de la inmunología celular mostraron que la frecuencia de células aloreactivas, era alta (Simonsen, 1.967).

Payne y Jaffe (1.962), estudiando la respuesta del injerto contra el huesped, describieron que la respuesta alogénica era más intensa que la xenogénica y, por tanto, la separación filogenética entre los individuos estaba en relación inversa con la capacidad de producir una respuesta inmunológica celular. Este planteamiento contribuyó al desarrollo de la hipótesis de Jerne (1.971), que especulaba sobre el papel que jugaban las moléculas del CMH en la aparición del repertorio inmunológico.

El porcentaje de células aloreactivas se ha fijado en un 2-6 % (Ryser, McDonald, 1.979). Esta frecuencia tan alta de células aloreactivas se puede explicar según tres hipótesis:

* Para Jerne, existen dos subpoblaciones separadas de células T, una presenta un receptor

que reconoce las moléculas del CMH extrañas y la otra tiene el receptor que se une al complejo antígeno nominal-moléculas del CMH propias (Jerne, 1.971).

* La segunda hipótesis, contempla a las células T con dos receptores, uno media la respuesta alogénica y el otro sirve para el reconocimiento antigénico restringido por el CMH (Heber-Katz, Wilson, 1.976).

* Por último la tercera hipótesis, considera que la célula T expresa un sólo receptor que es capaz de actuar en la respuesta alogénica y en la desarrollada frente a un determinado antígeno nominal (Hünig, Bevan, 1.980).

Se ha demostrado que el fenómeno de aloreactividad está íntimamente ligado al de restricción por el CMH, y que los receptores que median ambos procesos se expresan en la misma célula T (Von Boehmer y cols., 1.979) (Schmitt-Verhulst, Shearer, 1.975) (Lemonnier y cols., 1.977) (Sredni, Schwartz, 1.980). Sin embargo, la relación física entre los dos tipos de receptores no está definida. Un estudio reciente realizado con un clon de linfocitos T sugiere que un sólo receptor muestra una reacción cruzada entre una molécula del CMH alogénica y la asociación antígeno nominal-molécula propia del CMH (Hedrick y cols., 1.982).

I-2.6-3 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL POLIMORFISMO DE LOS ANTÍGENOS DEL CMH

El sistema inmune debe reconocer los antígenos

extraños en la superficie de las células y no ser distraído por otros antígenos. Para ello el antígeno se asocia a una molécula de la membrana celular. Las células T deben ser tolerantes para esta proteína cuando no se asocie a un antígeno ó se presente ligada a otros elementos del propio individuo y así evitar la autoagresión. Si esta molécula no fuera polimórfica podría ocurrir que penetrara un agente infeccioso con el que muestre cierta semejanza y ello ocasionaría una falta de respuesta por parte del sistema inmune, con la consiguiente proliferación del germen y muerte del individuo. El polimorfismo de las moléculas del CMH previene la posibilidad de coincidencia entre estas moléculas y cualquier agente infeccioso (Schwartz, 1.984).

Esta teoría planteada hace más de 15 años, aunque sin soporte experimental, es útil para explicar el significado biológico del polimorfismo de las moléculas del CMH.

I-2.7 IMPORTANCIA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS ANTIGENOS DEL CMH EN LA EVOLUCION DE LOS TUMORES

I-2.7-1 TIPOS DE GENES QUE CONDICIONAN EL ORIGEN Y DESARROLLO DE NEOPLASIAS

Los tumores surgen como consecuencia de transformaciones progresivas, que producen la ruptura de múltiples controles reguladores de los procesos de división y diferenciación celular.

Diversos estudios, histológicos y citogenéticos, confirman que la historia natural de los tumores

espontáneos malignos en humanos y en animales sigue un proceso de múltiples etapas con la aparición sucesiva de nuevos subclonos de células que sustituyen a sus predecesoras (Nowell, 1.976).

Foulds (1.958) analizó por vez primera el proceso de progresión tumoral. Consideró que el fenotipo neoplásico estaba constituido por varias unidades características capaces de una variación amplia y comportamiento independiente. A través de varias vías alternativas se podía alcanzar la expresión del mismo fenotipo. Cada etapa de progresión tumoral refleja la activación, mutación o pérdida de genes diferentes, entre los que se distinguen tres grupos funcionales:

* El primer grupo está representado por oncogenes, que actúan induciendo transformación tumoral cuando se transfieren a células en cultivo. El mejor empleo de este grupo de genes, es la familia "ras", en donde una simple mutación le confiere capacidad oncogénica (Yoakum y cols., 1.985).

* El segundo grupo incluye a genes supresores de los tumores o antioncogenes. Se denomina así porque para originar un tumor, estos genes, deben ser eliminados o anulados funcionalmente. El gen mejor estudiado dentro de este grupo, es el "rb-1", cuyos alelos se han perdido en las células tumorales del retinoblastoma (Cavenee y cols., 1.983) (Benedict y cols., 1.983). Parece ser que este gen tiene una función reguladora en células normales, posiblemente en la inducción de una etapa esencial en la diferenciación terminal del tejido (Murphree, Benedict, 1.984) (Robertson, 1.984).

* El tercer grupo de genes, denominados moduladores, influyen en el comportamiento de las neoplasias, condicionan su diseminación, pero no tienen capacidad de transformación oncogénica. Constituyen un grupo amplio y heterogéneo, entre ellos se encuentran los genes del CMH que se relacionan fundamentalmente con la capacidad metastásica de los tumores (De Baetselier y cols., 1.980) (Katzav y cols., 1.983).

I-2.7-2 Antígenos de histocompatibilidad y capacidad metastásica de los tumores

La función esencial de los antígenos HLA dentro del sistema inmune es la de actuar como moléculas de restricción en el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T (Doherty y cols., 1.976) (Gomard y cols., 1.976). Si una célula tumoral no expresa antígeno HLA de clase I en su membrana, carece de uno de los elementos, que en asociación al antígeno tumoral, es reconocido por los linfocitos T citotóxicos. Entonces la célula tumoral no sería atacada por el sistema inmune. (Schmidt, Festenstein, 1.982).

El problema fundamental reside en reconocer los mecanismos inmunológicos que intervienen en el rechazo de los tumores. Es preciso delimitar qué neoplasias inducen una proliferación y respuesta de linfocitos T citotóxicos para poder explicar cuando la pérdida de los antígenos HLA es la responsable de la diseminación tumoral. En neoplasias cuyo agente causal es un virus DNA, se ha demostrado que a través de la expresión de proteínas virales en la membrana de células tumorales se induce una estimulación de

los linfocitos T citotóxicos, restringidos por las moléculas de histocompatibilidad de clase I (Klein, Klein, 1.977) como sucede en tumores inducidos por el virus de Epstein-Barr (Saemundsen y cols., 1.982).

Otros tumores se desarrollan por la activación de oncogenes promovida por retrovirus (Hayward y cols., 1.981). Como la zona del retrovirus responsable de esta activación es muy pequeña y no codificante, el rechazo del tumor no se puede predecir hasta no conocer la expresión completa de proteínas virales por las células tumorales.

La mayoría de los tumores espontáneos surgen como consecuencia de la activación de oncogenes celulares por mecanismos no virales, tales como mutaciones puntuales, reordenamientos del DNA, amplificación génica, translocaciones cromosómicas etc. Los oncogenes están formados por proteínas normales o ligeramente modificadas. Por lo que es difícil explicar el rechazo inmunológico específico. Es posible que las proteínas codificadas por los oncogenes presenten mutaciones en la secuencia de sus aminoácidos que podrían originar determinantes antigénicos reconocidos como extraños por el sistema inmune del huésped (Klein, Klein, 1.985).

I-2.7-3 Expresión anormal de los productos del CMH en tumores

1) Modelos experimentales murinos

* Variaciones cuantitativas.

Se ha encontrado una relación inversa entre niveles de expresión de los antígenos asociados al tumor y los antígenos H-2 (Haywood, McKhann, 1.971). Estudios posteriores, confirman la ausencia o disminución de expresión de antígenos H-2 (Garrido y cols., 1.979) (Garrido, 1.979) (Ballinari y cols., 1.983) (Rosloniec y cols., 1.984).

Recientemente, se ha relacionado de forma más precisa la expresión H-2 con la eficacia de la lisis de células tumorales por parte de linfocitos T citotóxicos y con el crecimiento del tumor (Walich y cols., 1.985) (Tanaka y cols., 1.985).

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos del CMH, facilita estos estudios (Testorelli y cols., 1.980), y han contribuido a demostrar que algunos tumores han perdido la expresión de antígenos H-2, que están presentes en la membrana de las células normales autólogas (Schmidt y cols., 1.979) (Schrier y cols., 1.983).

Las células tumorales que han perdido su expresión H-2, son más agresivas (Plata y cols., 1.981) (Rogers y cols., 1.983). La expresión de antígenos H-2, es por tanto de gran importancia para la respuesta del huésped frente al tumor (Lakdar, Senik, 1.982) (Gooding, 1.982) (Katzav y cols., 1.984) (Eisenbach y cols., 1.983).

Garrido y cols., (1.986), en un tumor inducido con metil-colantreno detectaron heterogeneidad en cuanto a la expresión de antígenos de clase I, y consiguieron establecer varios clones a partir del

mismo tumor con diferente expresión de moléculas de clase I. Uno de los clones, mostraba unos niveles normales de moléculas de clase I y tenía un crecimiento local limitado, además era capaz de inducir protección si se administraba de forma adecuada. Otro clon, tenía una expresión muy reducida de moléculas H-2 con crecimiento local intenso y no inducía protección.

Todas estas experiencias, ponen de manifiesto que la pérdida de expresión de las moléculas del CMH de clase I, trae consigo la progresión tumoral por fallar en el reconocimiento de las células tumorales los linfocitos T citotóxicos. Si mediante transfección génica se consigue restablecer la expresión de estos antígenos, el tumor reduce su capacidad oncogénica, ya que entonces el sistema inmune puede reconocer a las células tumorales mediante los linfocitos T citotóxicos (Hui y cols., 1.984).

Como causa principal de la pérdida de expresión de los antígenos de clase I en células tumorales, se considera que existe una alteración en la transcripción de DNA a RNAm (Baldacci y cols., 1.983). Al variar las condiciones externas o tratar a las células con determinados factores, se consigue que las células tumorales reexpresen las moléculas de clase I (Ostrand-Rosenberg y cols., 1.983).

En otros casos la ausencia del producto de un gen de clase I se debe a una alteración a nivel del DNA en su secuencia de nucleótidos (Rogers y cols., 1.983).

* Cambios bioquímicos.

Se ha descrito que algunos de los tumores que expresan antígenos del CMH, son químicamente e inmunológicamente distintos de aquellos que presentan las células autólogas normales. Varios laboratorios han definido antígenos del CMH alogénicos o extraños en las células tumorales (Pliskin y cols., 1.978) (Ballinari y cols., 1.983).

En la actualidad, varios trabajos detectan, en células tumorales, antígenos del CMH que son químicamente distintos a los de las células autólogas normales, pero no se consideran como aloantígenos (Callahan y cols., 1.981) (Callahan y cols., 1.982) (Callahan y cols., 1.983).

Martin y cols., (1.977), describieron varios tumores pulmonares inducidos transplacentariamente en ratones C3HfB, que eran desde el punto de vista inmunológico cross-reactivos en los ratones ancestrales C3H y distintos de la cepa parental C3HfB. Uno de estos tumores, el LT-85 crecía de forma progresiva en ratones de la cepa ancestral C3H y era rechazado por los de la parental C3HfB. Callahan y cols., (1.983), por mapeo triptico demostraron que las moléculas H-2K^k del tumor LT-85 en algunas porciones de su secuencia de aminoácidos eran iguales a las de la cepa C3H y en otras regiones se parecían a las de la cepa C3HfB. Se había originado pues una nueva molécula posiblemente por un proceso de conversión génica a partir de la región telomérica del CMH en el cromosoma 17, denominada Qa/Tla. Esta nueva molécula no debe ser considerada como un aloantígeno clásico y se puede plantear que la aparente expresión de aloantígenos H-2 se deba a reacciones cruzadas fortuitas

basadas en la homología entre moléculas H-2 y antígenos parecidos (H-2-like).

Brickel y cols., (1.983) describieron, que con un clon de cDNA que codifica para los antígenos Qa/Tla, se pueden detectar niveles elevados de un determinado tipo de RNAm en células tumorales, lo que puede interpretarse como un aumento en la expresión de moléculas Qa/Tla o como expresión de procesos de conversión génica originados en esta región del CMH.

Aunque la importancia de estas observaciones para la genética molecular de los antígenos del CMH es grande, su papel dentro de la inmunología tumoral no está aún bien definido. En el caso del tumor LT-85 se considera que el antígeno modificado H-2K^k es el responsable del rechazo por parte de ratones singénicos (Callahan y cols., 1.982).

También es posible que las células tumorales que expresan antígenos H-2 alterados sean menos susceptibles a la lisis mediada por las células T del huésped, lo que originaría un aumento de la capacidad oncogénica de estas células (Chapdelaine y cols., 1.981). Por tanto es posible que las células transformadas que expresan antígenos H-2 alterados se conviertan en tumorales al escapar al control inmunológico. Si bien está claro que por este mecanismo se desarrolla una neoplasia, no se comprende como el huésped no reconoce como extraño un antígeno H-2 alterado (Callahan, 1.985).

Se cree que los antígenos GT-1 y GT-2 expresados en los carcinomas embrionarios y responsables

de la actividad NK frente a estos tumores, están codificados por genes de la región Qa/Tla (Brickel y cols., 1.983) y se han descrito reacciones cruzadas entre los carcinomas embrionarios y otros tumores sensibles a la actividad NK, como los inducidos por el virus SV40 o por metilcolantreno (Castro y cols., 1.974) (Medawar, Hunt, 1.978) (Sikora y cols., 1.977)

2) Variaciones cuantitativas y cualitativas en la expresión de los antígenos del CMH en las células tumorales humanas.

Existen muchos menos datos sobre la expresión de antígenos del CMH por las células tumorales humanas que en modelos experimentales murinos, debido sobre todo a las dificultades inherentes al estudio de una población exogámica. También hay que considerar que sólo recientemente se han conseguido estabilizar líneas celulares procedentes de un tumor y del tejido normal correspondiente de un mismo individuo (Callahan, 1.985). Sin embargo existen varios trabajos que sugieren que la expresión de antígenos del CMH por las células tumorales humanas es distinta a la observada en células normales (Trowsdale y cols., 1.980) (Travers y cols., 1.982).

Lampson y cols., (1.983), han descrito que algunas líneas celulares derivadas de neuroblastomas de alta malignidad no expresan antígenos HLA. La ausencia de los antígenos HLA se debe a la pérdida de expresión de la cadena pesada de las moléculas de HLA ya que la beta 2-microglobulina se sintetiza normalmente en estas células.

Doyle y cols., (1.985), han propuesto que la pérdida de los antígenos HLA en estas células puede facilitar su escape del sistema inmune del huésped y dotarlas de mayor capacidad oncogénica, aunque no existe ninguna evidencia directa que demuestre una relación entre la expresión de los antígenos HLA y la capacidad oncogénica de la células tumorales (Poupon y cols., 1.981).

Una línea celular de adenocarcinoma prostático, expresaba antígenos HLA alotípicos que no se encontraron en los linfocitos de sangre periférica del mismo paciente. Pero estos resultados no descartan la posibilidad de una contaminación alogénica y el empleo de anticuerpos policlonales dificulta su interpretación (Claas, Steenbrugge, 1.983).

En células de linfomas T humanos inducidos por virus se expresaban con facilidad antígenos HLA-A y B que no se detectaron en linfocitos B normales autólogos transformados por el virus de Epstein-Barr, ni en los de sangre periférica del paciente. Se cree que pueda deberse a reacciones cruzadas entre antígenos virales y algunos antígenos HLA (Clarke y cols., 1.983).

Otros trabajos (Robinson y cols., 1.981), dirigidos a caracterizar el fenotipo HLA de las células tumorales, han fracasado en demostrar diferencias entre el tumor y las células singénicas normales, pero como la mayoría de estas experiencias se han basado sólo en el empleo de reactivos serológicos, pierden valor, ya que se ha demostrado que una entidad serológica no implica identidad genética (Biddison y cols., 1.982) (Arden y cols., 1.982) (Owerbach y

cols., 1.983).

La caracterización serológica es inadecuada si se emplea como único medio para describir el fenotipo de los antígenos HLA de las células tumorales, ya que pueden existir diferencias significativas entre las células normales y las tumorales que son serológicamente invisibles (Newman, Graves, 1.982).

Aunque existe menos información sobre la expresión anormal de las moléculas HLA en los tumores humanos que sobre las moléculas H-2 en el modelo murino, los datos que hasta ahora se han registrado sugieren que las variaciones encontradas en los tumores murinos también pueden ocurrir en los humanos.

I-3 ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y MELANOMA MALIGNO

La progresión del MM está asociada a modificaciones en la expresión fenotípica de sus células (Brocker y cols., 1.985).

La transformación y progresión de los melanocitos humanos a MM puede asociarse con cambios en la expresión de antígenos de histocompatibilidad, que incluyen aparición de expresión de antígenos HLA de Clase II, reducción o desaparición en la expresión de antígenos HLA de Clase I y heterogeneidad en la expresión de ambos entre el tumor primario y su metástasis (Holzmann y cols., 1.987). Por ello, cualquier alteración en la expresión de antígenos de histocompatibilidad en las células de MM, se traduce en un comportamiento biológico distinto (Van Duinen y cols., 1.986).

I-3.1 ANTIGENOS HLA DE CLASE I

Los melanocitos normales presentan en su membrana moléculas de Clase I (Houghton y cols., 1.982) (Holzmann y cols., 1.987), por lo que la pérdida de expresión en células de MM es una anomalía. Se han descrito MM HLA-Clase I (-) (Ruiter y cols., 1.984) (Natali y cols., 1.985) (Brocker y cols., 1.985). Su expresión, en general, es alta en MM primitivos (Parmiani y cols., 1.986) y baja en sus metástasis (Ruiter y cols., 1.984).

Dado que la lisis de células tumorales

de MM está producida por linfocitos T citotóxicos (Anichini y cols., 1.985) y para que estos linfocitos reconozcan como extraña a la célula tumoral, estas tienen que expresar antígenos HLA de Clase I, su falta o disminución se traduciría en progresión tumoral.

Ruiter y cols., encontraron una menor expresión de moléculas HLA de Clase I en MM metastásicos que en MM primitivos (Ruiter y cols., 1.984) y Brocker y cols., observaron también una menor expresión de antígenos HLA de Clase I en MM invasivos (Brocker y cols., 1.985), de forma que la reducción de la expresión de antígenos HLA de Clase I puede influir en la capacidad metastásica del MM primitivo (Goodenow y cols., 1.985). Por el contrario, otros, no han encontrado diferencias entre MM primitivo y metastásicos (Taramelli y cols., 1.986).

La expresión de moléculas HLA de Clase I es heterogénea en una misma lesión y entre distintas lesiones de un mismo paciente. Esta heterogeneidad se puede explicar por:

1) Variaciones en la expresión relacionadas con el ciclo celular (Burchiel y cols., 1.982).

2) Por criterios de inmunoselección, de forma que los linfocitos T citotóxicos antitumorales sólo lisarían células que expresen antígenos HLA de Clase I, y las células HLA de Clase I negativas escaparían al control del sistema inmune y serían capaces de metastatizar (Ferrone y cols., 1.978).

3) Modulación antígenica, la producción

de gamma interferon, por parte de los linfocitos T sensibilizados frente al tumor del infiltrado, es capaz de inducir la expresión de antígenos HLA de Clase I (Adolf, 1.985).

Según el estadio evolutivo tumoral se detectan diferentes antígenos asociados a melanoma:

1) Antígenos constitutivos, que aparecen en todas las células de estirpe melánica (Bruggen y cols., 1.984).

2) Antígenos tempranos, cuya expresión disminuye con la progresión del tumor (Suter y cols., 1.985).

3) Antígenos tardíos, que aparecen en lesiones metastásicas (Bruggen y cols., 1.983).

Las moléculas HLA de Clase I, se consideran como antígenos temprano-intermedios (Brockner y cols., 1.985).

La falta o disminución de expresión de moléculas de Clase I por las células de MM, se ha relacionado, con la capacidad invasiva del tumor. Se ha visto una disminución de la expresión de Clase I a medida que aumenta el espesor de Breslow (Ruiter y cols., 1.982) (Brockner y cols., 1.985) (Holzmann y cols., 1.987) (Van Duinen y cols., 1.988), el nivel de Clark (Brockner y cols., 1.985) (López Nevot y cols., 1.986) (Brogelli y cols., 1.988), y por tanto con la progresión tumoral (Brockner y cols., 1.985).

También se ha descrito que la expresión de moléculas de Clase I en los tumores, va ligada al grado de diferenciación celular, de forma que, las células tumorales Clase I negativas suelen ser las más indiferenciadas, y por lo tanto con mayor capacidad proliferativa (Real y cols., 1.985).

I-3.2 ANTIGENOS HLA DE CLASE II

Las moléculas de Clase II no están presentes en los melanocitos normales (Herlyn y cols., 1.983) ni en nevus pigmentocelulares, nevus displásicos, o MM incipientes, en los MM se puede considerar como un proceso de neoexpresión (Holzmann y cols., 1.987). En condiciones normales, las moléculas HLA-DR sólo se detectan en células presentadoras de antígenos, Linfocitos B, Linfocitos T activados y células endoteliales.

Después de las primeras descripciones de moléculas HLA de Clase II en células de MM (Winchester y cols., 1.978) (Wilson y cols., 1.979), se ha visto que la expresión de antígenos DR es más frecuente en metastásicos que en los primitivos (Brockner y cols., 1.985), aunque Natali (Natali y cols., 1.983) encontró un porcentaje elevado de MM DR (+), tanto en primitivos como en metastásicos y Wilson (Wilson y cols., 1.979) encontró mayor expresión HLA-DR en MM primitivos que en los metastásicos, mientras que Parmiani encuentra una distribución similar de Clase I y II, tanto en MM primitivos como en metastásicos (Parmiani y cols., 1.986).

La expresión de Clase II aumenta con el nivel de Clark (Brockner y cols., 1.985) (Brogelli y cols., 1.988), y con el espesor de Breslow, sucede lo mismo (Ruiter y cols., 1.982) (Brockner y cols., 1.985) (Holzmann y cols., 1.987) (Van Duinen y cols., 1.988).

La expresión de moléculas de Clase II es un marcador de malignidad (Natali y cols., 1.984) no solo para MM primitivos, sino también para sus metástasis (Van Duinen y cols., 1.984). Su expresión en células de MM primitivos indica un alto potencial de metastatizar, aunque es independiente del espesor tumoral (Brockner y cols., 1.985). Brockner define a los antígenos HLA de Clase II, como marcadores tardíos-intermedios en la progresión tumoral (Brockner y cols., 1.985).

Se plantean tres hipótesis para explicar la expresión de moléculas de Clase II en melanomas:

1.- Persistencia de un estadio precoz de diferenciación: Se ha descrito que los melanocitos fetales y del recién nacido son HLA-Clase II positivos, por lo que dichas moléculas, se consideran como antígenos que aparecen en el proceso normal de maduración de las células melánicas, en sus estadios más tempranos, y posteriormente se pierden al alcanzar los melanocitos un mayor grado de diferenciación. La expresión de moléculas DR se asocia con determinadas características morfológicas del tumor como la baja actividad de la tirosinasa o nula pigmentación y citología epitelioide (Houghton y cols., 1.982).

2.- Ligado al proceso de transformación tumoral (Natali y cols., 1.984) (Holzmann y cols., 1.987). En este sentido, Albino y cols. (Albino y cols., 1.986), comprobaron la aparición de estos antígenos durante la transformación maligna de melanocitos inducida por el virus del sarcoma murino.

3.- Inducción por células T activadas. Se ha demostrado que es posible inducir la expresión de moléculas HLA de Clase II, in vitro, por interferon (Basham y cols., 1.983) (Houghton y cols., 1.984) (López Nevot y cols., 1.986). In vivo, esta neoexpresión puede producirse por el interferon gamma producido por los linfocitos del infiltrado peritumoral (Real y cols., 1.985) (Vreeswijk y cols., 1.988).

Las moléculas de Clase II intervienen en la presentación de antígenos, de forma que los linfocitos Th sólo reconocerían al antígeno tumoral si se presenta asociado a la molécula DR. La expresión de moléculas HLA-DR en células de melanoma, las capacitaría como células presentadoras de antígenos a los linfocitos Th que originarían la secreción de linfocinas (interleuquina 2, interferon, etc.), que inducirían la producción de linfocitos T supresores que bloquearían la respuesta antitumoral (Ting y cols., 1.982).

In vitro, Gerry y cols. encontraron que sólo las líneas celulares de MM obtenidas a partir de MM primitivos estimulan in vitro a los linfocitos autólogos y comprobaron que este estímulo está en proporción directa con la expresión de antígenos HLA de Clase II en la superficie de la célula tumoral.

Pero este estímulo sería clínicamente ineficaz si no hay expresión de HLA de Clase I adecuada, ya que no se produciría una actividad lítica (Gerry y cols., 1.984).

Taramelli y cols., describieron que las células de MM metastásicos HLA-DR (+) inhiben la estimulación de los linfocitos T autólogos, mientras que los MM primitivos HLA-DR (+) no tenían este efecto supresor (Taramelli y cols., 1.986). Así pues, la estimulación de la respuesta inmune dependería de las moléculas HLA-DR expresadas por MM primitivos, mientras que las moléculas de Clase II de MM metastásicos tendrían un efecto supresor.

El aumento del nivel de expresión de moléculas de Clase II es similar a la disminución de moléculas de Clase I, por lo que estas células, al carecer de determinantes HLA-I, no serían destruidas por los linfocitos T citotóxicos, y contribuirían a aumentar el número de células DR+ (Van Duinen y cols., 1.986). La relación entre la expresión HLA-DR y expansión de la enfermedad parece clara y por tanto los MM más indiferenciados tendrían un mayor número de clones en proliferación y por tanto mayor expresión HLA-DR.

Se deduce que cuanto mayor sea la expresión de antígenos HLA de Clase I más diferenciado es el tumor y será más indiferenciado, cuanto mayor sea la expresión de Clase II (Houghton y cols., 1.982) (Van Duinen y cols., 1.986).

La expresión coordinada de Clase I y II en células de MM puede sugerir un mecanismo por el

que las células de MM pueden escapar a la inmunovigilancia. La desaparición de antígenos de Clase I esquivaría la actividad citotóxica y la expresión de Clase II aumentaría la actividad supresora (Brogelli y cols., 1.988).

Es pues una situación conocida las modificaciones en la expresión de moléculas del CMH, con la neoexpresión de HLA Clase II y pérdida de Clase I, lo que supone una alteración fenotípica que implica modificaciones importantes en el comportamiento celular. Esta alteración de la expresión de caracteres fenotípicos, puede deberse a una alteración genética o bien, deberse a modificaciones en el proceso de transcripción de la información genética.

OBJETIVOS

- I.- Estudio de la expresión de antígenos de Clase I y II en células de MM primitivos y MM metastásicos.
- II.- Valoración de la correlación estadística entre la expresión de antígenos de histocompatibilidad y los factores de pronóstico clínicos e histológicos de Melanoma.
- III.- Establecimiento de líneas celulares "in vitro" de melanoma, e inducción experimental de antígenos de histocompatibilidad con gamma interferon.
- IV.- Estudio mediante técnicas de Southern de los genes de Clase I y Clase II del sistema mayor de Histocompatibilidad en Melanomas.

MATERIAL Y METODOS

Para desarrollar nuestra hipótesis de trabajo y alcanzar nuestros objetivos, realizamos un estudio en 27 pacientes con MM primitivos y 32 pacientes con MM metastásicos, intervenidos en la Unidad de Melanomas del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Granada. Las diferentes técnicas inmunológicas se realizaron en el Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital Virgen de las Nieves.

En todos los pacientes realizamos un Estudio Clínico detallado. Las piezas operatorias fueron procesadas con la técnica de Hematoxilina-Eosina para su análisis Dermopatológico. La expresión de los antígenos de Histocompatibilidad de Clase I y II, en los 27 melanomas primitivos y en las 32 metástasis, se estudió en cortes criostáticos con la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se aplicó un análisis estadístico a las relaciones entre los diferentes criterios clínicos e histológicos y la expresión de antígenos HLA de Clase I y II en los melanomas estudiados.

En el segundo apartado de nuestro trabajo se estableció una línea de melanoma (M1) a la que se aplicó la técnica de microscopía electrónica para confirmar su origen melánico. Las técnicas de radiounión e inmunoprecipitación se emplearon con la línea M1 para el análisis fenotípico de las moléculas HLA. El tratamiento con gamma interferon de esta línea M1 para inducir la expresión de moléculas HLA de Clase I y II. Finalmente la técnica de Southern Blot se utilizó para comparar los genes HLA de Clase I y II de la línea de melanoma M1 con los de células normales autologas.

PROTOCOLO DE MELANOMAS MALIGNOS: HLA

Nº: Edad: Sexo: Raza: 1.Blanca 2.Gitana Color Piel: 1.B 2.M
Color ojos: 1.Negro 2.Castaños 3.Verdes 4.Azules
Color pelo: 1.Negro 2.Castaño 3.Rubio 4.Rojo

ANTECEDENTES FAMILIARES:

Diabetes Cancer C.Cutaneo Melanoma
Pad.-Herm.:
Otros:

ANTECEDENTES PERSONALES:

Tumor previo Expuesto: 0.No 1.< 3h 2.2-8h 3.> 8h
Exposición Solar: 1.Crónica 2.Intermitente
Precancer Cutaneo-Mucoso: ciado: 1.Carcinoma 2.Basalioma 3.Melanoma
Nevus: 1.< 20 2.> 20

CARACTERISTICAS DEL TUMOR:

Forma Clínica: 1.MN 2.LMM 3.SSM 4.Acral Pigmentado: Ulcerado:
Dimensiones: cm Localización: Metámera:
Tiempo de Evolución: Estadío: Ganglios: 1.Cuello 2.Axila 3.Ingle
Termograma: 1.Th1-f 2.Th1-i 3.Th2 4.Th3 5.Th4 6.Th5 7.Th5-1

DATOS HISTOLOGICOS

Clark:

Breslow: 1.(< 0.75) 2.(0.76-1.5) 3.(1.51-2.25) 4.(2.26-3.0) 5.(> 3)

Mitosis: 1.Escaso 2.Moderado 3.Intensa Infiltrado:

Citología: 1.Globocelular 2.Fusocelular 3.Mixto

Fecha de intervención del tumor:

Metástasis: 1.No 2.Cutáneas 3.Ganglionares 4.Viscerales 5.dos-tres

N.E.D.:

Situación actual: 1.Vive 2.Exitus

A.W.D.:

EXPRESION HLA:

1.(-) 2.(25-50%) 3.(50-75%) 4.(100%) 5.(15-25%)

T-HLA I

T-HLA II

M-HLA I

M-HLA II

II-1 ESTUDIO CLINICO

De acuerdo con un protocolo de recogida de datos , que incluyen las siguientes variables:

A.-Criterios obtenidos por la exploración:

Sexo, Edad, Localización, Forma Anatómico-clínica, Tamaño del tumor, Caracteres fenotípicos, Número de nevos, presencia de precancer y cancer cutáneo asociado, Pigmentación y Termografía. Para el estudio termográfico de los MM primitivos empleamos el Sistema AGA-Termovisión 680 Medical, de fabricación sueca, con un detector puntual de antimoniuro de iridio alojado en un vaso Dewar, instalado en la Unidad de Melanomas del Servicio de Dermatología.

B.-Criterio obtenidos por la Historia Clínica:

Tiempo de evolución (en años), Historia de Exposición al sol, Antecedentes familiares, Estadio Evolutivo, N.E.D. y A.W.D.

Con las piezas operatorias realizamos:

II-2 TECNICAS HISTOLOGICAS

II-2.1 DERMOPATOLOGIA

MATERIAL

Estudiamos 59 piezas quirúrgicas correspondientes a 27 MM primitivos y 32 MM metastásicos.

Tallado y procesado según la técnica habitual, en la sección de Dermopatología de la Cátedra de Anatomía

Patológica de la Facultad de Medicina de Granada (Fijación en formol al 10 %, inclusión en parafina, cortes de 5 micras y tinción con hematoxilina-eosina).

Todas las preparaciones fueron examinadas en un microscopio NIKON HFX-IIA.

METODO

Obtenemos los siguientes parametros:

1) Tumores primitivos

* Nivel de invasión, según los criterios de Clark, que establecen 5 niveles (Clark y cols. 1.959):

- Nivel I: Tumor intra-epidérmico.
- Nivel II: Invasión fragmentada de dermis papilar.
- Nivel III: Invasión de dermis papilar.
- Nivel IV: Invasión de dermis reticular.
- Nivel V: Invasión de hipodermis.

* Espesor del tumor, Breslow propuso la medida del espesor máximo del tumor, lo que implica el empleo de micrómetro ocular y cortes seriados verticales. Se establecieron varios grupos (Breslow, A., 1.970):

- < 0,75 mm
- 0,75 mm - 1,5 mm

- 1,5 mm - 4 mm
- > 4 mm

* Patrón de crecimiento, McGovern propone la siguiente clasificación (McGovern y cols., 1.973):

- Melanoma sin componente adyacente: Melanoma Nodular (MN).
- Melanoma con componente adyacente del tipo de Melanoma de extensión superficial (SSM).
- Melanoma con componente adyacente del tipo Lentigo maligno melanoma: LMM.
- Melanoma con componente adyacente del tipo Lentiginoso acral: ALM.

* Tipo celular, existen 3 tipos:

- Globocelular
- Fusocelular
- Mixto

* Infiltración linfocitaria peritumoral, que se ha clasificado:

- Intensa (+++)
- Moderada (++)
- Escasa (+)

Actividad mitótica, McGovern y Murad establecen que las mitosis deberían ser contadas en un área de

1 mm² en aquella zona de la pieza donde fueran más numerosas y proponen 3 grados (McGovern, V.J.; Murad, T.M., 1.985)

- Grado 1: < 1 mitosis/5 campos
- Grado 2: 1 m/5 c - 1 m/1 c
- Grado 3: > 1 m/1 c

* Pigmentación.

* Ulceración.

2) Metástasis ganglionares y cutáneas

* Estudio del tumor primitivo según los parámetros anteriormente descritos.

* Estudio de las metástasis, siguiendo los parámetros de:

- Tipo celular
- Actividad mitótica
- Pigmentación

II-2.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA

MATERIAL Y REACTIVOS

Piezas quirúrgicas. Glutaraldehído al 2,5 %. Tetraóxido de Osmio al 1 %. Agua destilada. Acetona de 70. Acetato de Uranilo. Acetona de 100. Óxido de Propileno. Resina de Spur. Resina pura. Cápsulas de Beem. Citrato de Plomo. Estufa. Ultratome III de LKB.

Cuchillas de vidrio. Microscopio electrónico Seol-Sem 100 B.

METODO

Se ha realizado en la Sección de Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Granada.

1) Fijación: La pieza de melanoma obtenida por extirpación quirúrgica, se fija en glutaraldehído al 2,5 % durante 2-6 horas. Lavado en tampón y posterior fijación en tetraóxido de osmio al 1 %, nuevo lavado con agua destilada.

2) Deshidratación de la pieza: Se realiza en acetona de 70 mezclada con Acetato de Uranilo, durante 2 horas. Dos baños en acetona de 100 durante 15 minutos cada uno y posteriormente dos baños en Oxido de Propileno de 15 minutos cada uno.

3) Inclusión o penetración: En mezcla de Oxido de Propileno y resina de Spur a partes iguales durante una hora y media. Después toda la noche en resina pura. Inclusión en capsulas de Beem y se polimeriza en estufa a 60°.

4) Corte: Se utiliza un Ultratome III de LKB y cuchillas de vidrio. Se obtienen cortes de 400 A que se contrastan con Acetato de Uranilo al 8 % durante 30 minutos y Citrato de Plomo durante 5 minutos.

5) Visualización en microscopio electrónico Seol.

II-2.3 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA SOBRE CORTES
CRIOSTATICOS

Según técnica descrita por Natali y cols.,
(1.983).

MATERIALES Y REACTIVOS

Piezas quirúrgicas. Cortes en congelación.
Portas. Cubreobjetos. Medio de montaje Crio-M-bed).
Bandeja para los portas. Cámara húmeda.

Anticuerpos monoclonales:

AcMo	Especificidad
GRH1 (Lopez Nevot y cols., 1.986)	B-2-microglobulina
W6/32 (Brans-Table, 1.978)	Cadena pesada antige- nos HLA clase I.
GRB1 (Ruiz-Cabello, 1.985)	HLA clase II determi- nante monomórfico(DR)
GRT2 (lopez Nevot y cols., 1.986)	Antígeno panleucoci- tario.

Inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjuga-
das a fluoresceina (RAM-FITC) (Nordick).

Glicerol tamponado. PBS.

Criostato 5030(Bright instruments Co.).
Microscopio de fluorescencia.

METODO

1) Las piezas de melanoma se congelaron en ni-
trogeno líquido en las 2 horas siguientes a la interven-
ción.

2) Del contenedor de nitrógeno líquido se pasan al criostato para realizar cortes de 4 micras de espesor. los cortes se colocan en portas y se fijan con acetona durante 5 minutos antes de congelarlos a -20°C .

3) Para su empleo los cortes sobre portas se descongelan con PBS en frío durante 10 minutos y a continuación se incuban con el primer anticuerpo durante 30 minutos en cámara húmeda.

4) Cuatro lavados con PBS sobre el porta; inmediatamente después de la primera incubación, a los 10', 20' y 25'.

5) Incubación a 30' en cámara húmeda con la inmunoglobulina de conejo anti-ratón marcada con fluoresceína (RAM-FITC).

6) Cuatro lavados con PBS, igual que en el apartado 4).

7) Secado de la zona del porta no ocupada por los cortes y montaje del cubreobjetos con una gota de glicerol tamponado.

8) Observación al microscopio de fluorescencia.

II-3 CULTIVO CELULAR

Según técnica de Houghton y cols., (1.982).

MATERIALES Y REACTIVOS

Pieza quirúrgica.

Medio de cultivo: RPMI 1640 con:

- Glutamina 2 mM
- Ampicilina 500 mg/ml y Gentamicina 40 mg/l.

- Suero fetal 15 %.

Frascos de cultivo (Falcon) de 75 ml.

Tubos universales estériles.

PBS con 0,25 % de tripsina.

Colador. Agujas. Jeringas. Filtros de 0,45 μ m.

Cámara de flujo laminar.

Estufa de 37°C con CO₂.

Centrifuga.

Microscópio de contraste de fase.

METODO

- 1) En condiciones de esterilidad, dentro de la cámara de flujo laminar, la pieza de melanoma se trocea y disgrega mecánicamente sobre un colador mientras se añade PBS. La suspensión celular así obtenida se pasa por varias jeringas, con agujas de distintos tamaños para deshacer los grumos.
- 2) Se realizan dos lavados con PBS, centrifugando a 1.800 rpm durante 10 minutos.
- 3) El botón celular se resuspende con medio de cultivo, previamente filtrado, para alcanzar una concentración de 5×10^5 células/ml. La suspensión celular se reparte en frascos de cultivo a razón de 5 ml por frasco.
- 4) Las células se cultivan en la estufa a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5 %.
- 5) Cada 3 días se realiza el cambio de medio de cultivo

Para ello la mitad del volumen del medio de cada frasco se vierte en un universal y se centrifuga a 1.800 rpm durante 10 minutos. Este volumen se repone en cada frasco con medio fresco. Después de la centrifugación, el botón celular se resuspende en medio y se pasa a un nuevo frasco de cultivo.

- 6) El crecimiento celular se controla por microscopía de contraste de fases.
- 7) Cuando en un frasco de cultivo se observa que las células han ocupado en su crecimiento toda la superficie disponible se realiza la expansión a otro recipiente. La expansión se realiza despegando las células con PBS adicionado de tripsina al 0,25 % durante una incubación de 15' a 37°C. Las células despegadas se centrifugan a 1.800 rpm durante 10' y después de resuspender el botón celular con medio se reparten en dos frascos de cultivo.

II-4 CONGELACION Y DESCONGELACION DE CELULAS

- 1) Congelación de células de melanoma.

MATERIALES Y REACTIVOS

Suero fetal con DMSO al 10 %.

Criotubos de 2 ml (Nunc).

Congelador de -80°C.

Contenedor de nitrógeno líquido.

METODO

La congelación se llevó a cabo con suero fetal (Gibco) más DMSO al 10 % que se añade a las células del melanoma hasta conseguir una concentración de $2-5 \times 10^6$ células/ml. El suero fetal más DMSO se emplea a 4°C. La suspensión celular se reparte en los criotubos situados sobre una cubeta con hielo y rápidamente se colocan en el congelador de -80°C. A las 24 horas los tubos de congelación se pasan al contenedor de nitrógeno líquido a -135°C.

2) Descongelación de células de melanoma.

MATERIALES

Tubos universales

PBS esteril

Baño de 37°C.

METODO

Para descongelar las células de melanoma, los criotubos se sacan del contenedor de nitrógeno líquido y se colocan en un baño de 37°C. Posteriormente se vierte su contenido en tubos universales que tienen PBS esteril a una temperatura de 37°C. Se realizan dos lavados con PBS esteril y las células se ponen a cultivar.

II-5 TRATAMIENTO IN VITRO CON GAMMA-INTERFERON

Según la técnica de Tarasmelli y cols., (1.986).

MATERIALES Y REACTIVOS

Células de melanoma en cultivo.

Interferón gamma (Boehringer). Título: $4,6 \times 10^7$ unidades/ml. Actividad específica: 2×10^7 unidades/mg de proteína.

Placas microtiter de 96 pocillos.

METODO

1) Las células del melanoma ML en cultivo se situaron en pocillos de placas de 96, a una concentración de 10^5 células por pocillo. Para cada ensayo se emplearon tres pocillos.

2) El interferón gamma se añadió a una concentración de 50 u/ml.

3) Se dejó incubar 72 horas en estufa a 37°C con CO_2 al 5 %.

4) Se realizaron tres lavados centrifugando a 1.800 rpm durante 10 minutos.

5) Se cuantificó la variación en la expresión de los antígenos HLA de la clase I y II por la técnica de radiounión.

6) Como control se emplearon células de la línea KM3 establecida a partir de una leucemia linfoblástica común.

II-6 TECNICA DE RADIOUNION

Según la técnica de Garrido y cols. (1.986).

MATERIALES Y REACTIVOS

Células de melanoma (ML).

Anticuerpos monoclonales: W6/32

GRB1.

Inmunoglobulina de conejo antiratón. Fragmentos F (ab')₂ marcados con I¹²⁵ (Amersham).

PBS-azida sódica (10 mM NaN₃)

Placas microtiter de 96 pocillos.

Centrifuga para placas.

Contador gamma.

METODO

1) Las células del melanoma ML se distribuyeron en los pocillos de una placa microtiter de fondo en U a razón de 2×10^5 células en 0,1 ml de medio por pocillo.

2) La placa se centrifugó a 1.800 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante.

3) Las células se incubaron con 25 ul del anticuerpo monoclonal correspondiente, durante una hora en hielo. Para cada anticuerpo monoclonal se utilizaron cuatro pocillos.

4) Se realizaron tres lavados con PBS-azida.

5) Después del último lavado se retiró el

sobrenadante y las células se incubaron durante otra hora en hielo con 25 ul de F(ab')₂ antiratón marcado con I¹²⁵.

6) Se realizaron cinco lavados con PBS-azida.

7) Finalmente las células se resuspendieron en 200 ul de medio de cultivo. 100 ul de la suspensión celular se emplearon para medir en un contador gamma la radioactividad fijada.

8) Las cuentas específicas se calcularon restando a los valores obtenidos con los Ac MO W6/32 y GRB1 las cifras correspondientes a las células tratadas con un AcMo irrelevante (OKT3, específico de células T).

II-7 TECNICAS INMUNOQUIMICAS

II-7.1 ACOPLAMIENTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL A GEL DE SEFAROSA ACTIVA 4B-CN Br

Según técnica descrita por el fabricante (Pharmacia Fine Chemicals).

REACTIVOS Y MATERIALES

Anticuerpo monoclonal purificado. GRH1.

Tampón de acoplamiento: CO₃ NaH 0,1 M
ClNa 0,5 M
pH: 8,3

Gel de sefarosa 4B activada CN Br (Pharmacia Fine chemicals).

Solución de ClH 1 mM.

Solución bloqueante de grupos activos: solución 0,2 M, pH 8 (Merck art. 4201).

Tampón de acetato sódico 0,1 M pH 4, conteniendo ClNa 0,5 M.

Bolsas de dialisis.

Agitador magnético.

Filtro de vidrio de 63 de porosidad.

Matraz Kitasato (Simax).

Bomba de vacío.

METODO

1) Se disuelve 1 ml de anticuerpo monoclonal purificado en 2 ml de tampón de acoplamiento.

La solución se coloca en una bolsa de dialisis que se deja durante 18 horas a 4°C, frente a un litro de tampón de acoplamiento. La solución se mantiene en agitación cambiándose el tampón cada 6 horas.

2) Se pasa 1 g de gel de sefarosa 4B activada CNBr que se mezcla con 10 ml de una solución 1 mM de ClH durante 15 minutos, posteriormente se lava con la misma solución, utilizando un filtro de vidrio de 63 de porosidad, unido a un matraz Kitasato, conectado a una bomba de vacío. Para el lavado se utiliza un volumen total de 200 ml de la solución de ClH, en 10 alícuotas de 20 ml, aspirándose el sobrenadante entre los sucesivos lavados. Aproximadamente un gramo de gel después del lavado, alcanza un volumen de 3,5 ml.

3) El gel se lava posteriormente con 5 ml de tampón de acoplamiento e inmediatamente se mezclan 2 ml de la solución del ligando (2 ml de la solución del anticuerpo monoclonal dializada frente a tampón de acoplamiento) con 1 ml de la suspensión del gel durante 2 horas, a temperatura ambiente, en agitación suave.

4) El gel se centrifuga a 300 g durante 5 minutos, transfiriéndose a continuación a una solución 0,2 M de glicina de pH 8 durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave, para bloquear los grupos activos que habían quedado sin acoplar.

5) El gel se lava 5 veces alternativamente con tampón acetato conteniendo ClNa para eliminar las proteínas ligadas no covalentemente.

II-7.2 MARCAJE EXTERNO CON ^{125}I

(Vitetta y cols., 1.971).

REACTIVOS Y MATERIALES

^{125}I Na: 1 mCi (General Radioquímica).

Lactoperoxidasa: 200 ug.

PBS

H_2O_2 al 0,06 % (Merck art. 822287).

Tubos universales.

Células de melanoma 80×10^6 .

METODO

Las células de melanoma son recogidas y lavadas 2 veces con PBS, después del último lavado se resuspenden en 1 ml de PBS conteniendo 200 ug de lactoperoxidasa, manteniendo la suspensión en baño de hielo. A la mezcla se le añade 1 mCi de ^{125}I Na y se comienza la reacción con la adición de 10 ul de H_2O_2 al 0,06 %, a los 2,5 minutos se le añaden otros 10 ul de H_2O_2 , volviendo a repetir la operación 2,5 y 5 minutos más tarde. Tras la última adición de 10 ul de H_2O_2 se esperan 5 minutos tras lo cual se añade PBS frío y se lavan 2 veces.

Durante el proceso del marcaje se debe agitar la suspensión celular con frecuencia y de forma suave, manteniéndose a una temperatura de 4°C.

II-7.3 LISADO DE LAS CELULAS MARCADAS

REACTIVOS

Azida sódica (Merck, art. 822335).

ClNa (Merck, art. 6404).

EDTA (sal disódica del ácido Etilendiaminotetraacético, dihidratado) (Merck, art. 8421).

Etanol.

NP-40. Nonidet-40 (Acetilfenilpolietilenglicol) (Flucka, 74.385).

P.M.S.F. (Fenilmetilsulfonilfluoride) (Sigma nº 7626).

Tris (Hidroximetil-aminometano) (Merck, art. 8386).

SOLUCIONES

1. Solución tampón de lavado I:

10 mM Tris/ClH

150 mM ClNa (Merck, art. 6404)

pH 7,4

2. Solución tampón de lisis:

184,9 mg iodoacetamida

300 ul de EDTA 0,1 M

100 ul de NP-40

9,39 ml de PBS frio

Justo antes de lisar añadir a la mezcla resultante 100 ul de solución P.M.S.F.

3. Solución P.M.S.F.:

2 mg de P.M.S.F. (Phenyl Methyl sulfonilfluoride) disueltos en 40 ml de etanol.

4. Solución tampón de lavado II:

0,125 M Tris

0,5 N ClNa

0,5 % NP-40

10 mM EDTA

pH 8,2

MATERIALES

Tubos Eppendorf.

Microcentrifuga.

METODO

Preparación del lisado celular.

1) Lavado: Las células ya marcadas son primeramente lavadas con PBS y después con solución tampón de lavado a la que se agrega 40 ul de P.M.S.F.

2) Lisis: Después de este lavado las células son resuspendidas en 1 ml de solución tampón de lisis e incubadas a 4°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifuga a 15.000 rpm durante 20 minutos separandose un lisado donde se encuentran las proteínas, tanto de membrana como citoplasmáticas, y un precipitado que contiene restos celulares.

II-7.4 INMUNOPRECIPITACION

El lisado, después de la purificación, se enfrenta con 100 ul de sefarosa 4B, que tiene acoplado el AcMo, durante 4 horas a 4°C. Después se lava tres veces con la solución de lavado II y otras tres veces con PBS.

II-7.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN S.D.S.

(S.D.S P.A.G.E.) (Laemmli, 1.970).

REACTIVOS

- Acrilamida. (Bio-Rad, catálogo: 161-0 100).
- Bis Acrilamida (Merck, art. 10897).
- Bromofenol (Shandon Southern, 2560080).
- Glicerol (C.I.D.).
- Glicina (Merck, art. 4.201).
- 2-Beta-Mercaptoetanol (Bio-Rad, catálogo: 161-0710).
- 2-propanol. (Merck, art. 9634).
- Persulfato amónico. (Bio-Rad, catálogo: 161-0700).
- S.D.S. Sulfatododecil-sódico. (Bio-Rad, catálogo: 161-0301).
- TEMED.N,N,N'N' Tetrametiletilendiamino (Merck, art. 10.732).
- Tris/ClH. (Merck, art. 8.386).
- Controles de peso molecular. (Amersham CFA. 645):
- Lisozima. Pm, 14.300.
 - Anhidrasa carbónica. Pm, 30.000.
 - Ovaalbúmina. Pm, 46.000.
 - Albúmina humana. Pm, 69.000.

Las proteínas de los controles de peso molecular van marcadas con C^{14} .

SOLUCIONES

Solución de Acrilamida Madre:

- 22,2 g de acrilamida.
- 0,6 g de bis acrilamida.
- agua destilada 100 ml.

Solución tampón gel inferior:

- 1,5 M Tris/ClH pH 8,8.

Solución tampón gel superior:

- 0,5 M Tris/ClH pH 6,8.

Solución S.D.S.:

- 10 % de S.D.S. en agua.

Solución de persulfato amónico:

- 100 mg de persulfato amónico disueltos en
- 1 ml de agua.

Solución de bromofenol:

- 0,2 % de bromofenol en agua.

Solución tampón de la muestra:

- 10 ml de glicerol.
- 12,5 ml de tampón de gel inferior.
- 10 ml de solución de S.D.S.
- 5 ml de solución de azul de bromofenol.
- 5 ml de 2 mercaptoetanol.
- agua bidestilada hasta 100 ml.

Tampón de electroforesis:

- 1.- Glicina 8,8 g/l.

- 2.- Tris 6,06 g/l.
- 3.- S.D.S. 1 g l/l (sulfato-dodecyl-sódico).
- 4.- Agua destilada hasta 1 litro.

El mercaptoetanol se añade inmediatamente antes de su uso.

MATERIALES

Cubeta LKB 2001.

Fuente alimentadora-LKB (Biorchrom 2.103).

METODO

Una vez finalizados los lavados, el complejo formado por sefarosa 4B-AcMo antígeno se disgrega y reduce agregandole 100 ml de solución tampón de la muestra y sometiendo a ebullición de 5 a 10 minutos, transcurridos los cuales el antígeno esta liberado y se le somete a la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia DE S.D.S. (S.D.S.-PAGE). Al mismo tiempo se realiza la electroforesis de un control de pesos moleculares.

Los geles de poliacrilamida se preparan según describen Weber y Osborn (1.969). Para la preparación del gel inferior se emplea la siguiente mezcla:

Solución de acrilamida	17	ml
Solución tampón gel inferior	7,5	ml
H ₂ O	4,9	ml
Solución S.D.S.	0,3	ml

Solución de persulfato	0,2 ml
TEMED	0,02 ml

Los tres primeros componentes se mezclan en la primera fase, desgasificándose, tras lo cual se añade el S.D.S., Persulfato y TEMED son añadidos justo antes de introducir la mezcla en el molde. Una vez introducida la mezcla, se le cubre con una pequeña capa de propanol para que el frente del gel sea recto. El proceso de polimerización lleva de 30 minutos a una hora, tras lo cual se retira el propanol y se le agrega la mezcla para la fabricación del gel superior. Mezcla formada por:

Solución de acrilamida	2,25 ml
Solución tampón gel superior	2,50 ml
H ₂ O	5 ml
Solución S.D.S.	0,1 ml
Solución de persulfato amónico	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

La mezcla se realiza de una sola vez y sin desgasificación. A los 30 minutos el gel está listo para su uso.

La electroforesis se corre durante la noche a una intensidad de 180 mA.

La cubeta usada en nuestro trabajo ha sido la LKB 2001.

II-7.6 PREPARACION DEL GEL PARA LA AUTORADIOGRAFIA

1.- Fluorografía

Tiene como finalidad impregnar el gel de PPO que amplifica la radiaciones beta, emitidas por el carbono 14, utilizado para marcar los controles de peso molecular. De esta manera los controles podran impregnar la placa de autoradiografía.

REACTIVOS

Acido acético (Euro-Kurz).

D.M.S.O. Dimetil-sulfóxido (Merck, art. 2931).

Metanol (Riser).

P.P.O. (2.2-Difenilo-azol).(Merck, art. 2946).

SOLUCIONES

- Solución fijadora:

Metanol 25 %

Acido acético 10 %

- Solución PPO/DMSO:

PPO 26,6 g

DMSO 120 ml

METODO

a) El gel después de concluida la electroforesis, se corta con una cuchilla, por la línea de separación entre las porciones superior e inferior.

b) La porción inferior se coloca en un baño de solución fijadora durante 30 minutos.

c) Treinta minutos en DMSO antiguo (usado).

d) Treinta minutos en DMSO nuevo.

e) Tres horas en la solución PPO/DMSO.

f) Cuarenta minutos en agua corriente.

2.- Secado del gel

MATERIALES

Papel de celofan.

Papel Wathmann.

Secador de geles (LKB. 2003).

Bomba de vacio.

METODO

a) Después del último lavado en agua el gel se coloca sobre un trozo de papel Wathmann húmedo que está situado sobre la rejilla del secador.

b) El gel se cubre con un papel celofan y la rejilla se coloca en el secador.

c) El secador se conecta a la bomba de vacio y antes de encenderlo se comprueba la colocación correcta del gel.

d) Se interrumpe el secado a los treinta minutos.

AUTORADIOGRAFIA

El gel una vez seco, se situa dentro de un chasis con una placa de radiografia. Se deja en el congelador de -80°C y la placa se revela a los tres o cuatro dias. El tiempo de exposici3n varia seg3n la intensidad del marcaje con I^{125} de las proteínas inmunoprecipitadas.

II-7.7 CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS INMUNOPRECIPITADAS

Al revelar la placa radiográfica se observan las bandas de los controles de peso molecular y las de las proteínas inmunoprecipitadas.

Se calculan las distancias relativas de todas las bandas. La distancia relativa de una banda es la relación entre la distancia recorrida por esta banda y la distancia alcanzada por el frente del gel.

Los valores de los pesos moleculares en Kd de los controles, divididos por 10^4 , se llevan a las ordenadas de una gráfica semilogarítmica y en abcisas se sitúan los valores de sus distancias relativas. Con los puntos de intersección se traza una recta.

Los pesos moleculares de las proteínas inmunoprecipitadas se extrapolan en la gráfica a partir de sus distancias relativas.

II-8 TECNICA DE SOUTHERN BLOT

La aplicación de esta técnica tiene como objetivo comparar la estructura de los genes que codifican para las moléculas HLA de clases I y II de un melanoma con células normales procedentes del mismo individuo. Para el estudio de los genes de clase I se empleó la sonda Pdp 001 que codifica para el antígeno HLA-B7 (Sood y cols., 1.981), tiene un tamaño de 1,4 KB y está inserta en el plásmido PBR 322. Para el estudio de los genes de clase II se empleó la sonda pII β -3 (Gustafsson y cols.1984) que es un cDNA obtenido de la línea celular Raji (DR 3/w6) y que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena DR β . Estas sondas están insertas en el plásmido pBR322 que posee los genes de resistencia a la ampicilina y a las tetraciclinas y un número adecuado de puntos de corte para las enzimas de restricción (Belivar y cols., 1.977). El plásmido pBR322 es uno de los más empleados y se conoce su secuencia completa (Sutcliffe, 1.979).

ETAPAS DE LA TECNICA DE SOUTHERN BLOT

II-8.1 PREPARACION DE LA SONDA

II-8.1.1 Aislamiento del plásmido.

II-8.1.2 Aislamiento de la sonda pII β -3.

II-8.1.3 Linealización del plásmido que contiene la sonda Pdp001.

II-8.1.4 Marcaje isotópico con P³² de las sondas (Nick Translation).

II-8.2 PREPARACION DEL FILTRO PARA LA HIBRIDACION

- II-8.2.1 Aislamiento del DNA de alto peso molecular.
- II-8.2.2 Cuantificación del DNA.
- II-8.2.3 Digestión con enzimas de restricción para "Blotting".
- II-8.2.4 Electroforesis en gel de agarosa.
- II-8.2.5 Transferencia a papel de nitrocelulosa.

II-8.3 HIBRIDACION

II-8.1 PREPARACION DE LA SONDA

II-8.1.1 Aislamiento del plásmido.

- II-8.1.1.1 Cultivo de bacterias (Maniatis y cols., 1.978).

REACTIVOS

- Medio de cultivo LB (para un litro):

Bactotripton	10 gr.
Extracto de levadura	5 gr.
ClNa (Merck, ref. 6404)	10 gr.
H ₂ O	hasta 1 litro.

pH: 7,5.
- Solución de tetraciclina: 12,5 mgr/ml, se conserva a -20 °C.
- Solución de ampicilina en agua: 25 mg/ml, se conserva a -20 °C.
- Bacterias de la cepa 490 A de E.Coli: se conservan congeladas a -80 °C en medio LB con DMSO (dimetil sulfoxido).

MATERIALES

Matraces de vidrio de 2 litros.

Manureductor.

Baño de 37 °C.

METODO

- El medio de cultivo LB se esteriliza en autoclave y la boca de los matraces se cierra con gasa y papel de aluminio. Se mantiene a 4 °C hasta su empleo.

- Para cada siembra de bacterias, se utilizan 400 ml de medio de cultivo LB, dispensados en matraces de 2 litros. Con una punta esteril se añade el antibiótico: tetraciclina (2 ml de la solución por litro de medio) en el caso de la sonda Pdp 001 y ampicilina (1 ml de la solución por litro de medio) para la sonda pII β -3. Posteriormente se realiza la siembra con el material obtenido por raspado de un criotubo que contiene las bacterias congeladas.

- Se cultiva en baño de 37 °C durante 18 horas con sistema de aireación por manureductor.

II-7.1.1.2 Lisis alcalina de las bacterias.

Con este procedimiento las cadenas lineales del DNA cromosómico de las bacterias se desnaturalizan mientras que el DNA plamídico permanece en su forma nativa. Esta técnica se aplicó según el método de Birnboim y Doly (1.979).

REACTIVOS

- Alcohol isopropílico (propanol) (Merck,

ref. 9634).

- Lisozima

- Solución Tris-ClH 1M pH 8:

121 g de Tris (Tris hidroximetil aminometano) (Merck, ref. 8386).

42 ml de ClH (Merck, ref. 317).

H₂O hasta 1 litro previo ajuste del pH a 8 con ClH concentrado.

Se esteriliza en autoclave.

- Solución alcalina de lisis I:

Glucosa (Merck, ref. 8342) 50 mM.

Tris-ClH 25 mM. (pH:8)

EDTA (A.etilendiaminotetraacético) (Merck, ref. 8421) 10 mM.

Se esteriliza en autoclave y se mantiene a 4 °C.

- Solución alcalina de lisis II:

Hidroxido sódico (Merck, ref. 5033) 0,2 N.

Dodecil sulfato sódico (SDS) (Merck, ref. 822050) 1 %

Se prepara en el momento de su empleo.

- Disolución TSE:

ClNa 0,1 M

Tris-ClH 10 mM. (pH:8)

EDTA 1 mM.

- Disolución TE:

Tris-ClH 10 mM. (pH:8)

EDTA

1 mM. (pH:8)

- Solución de acetato potásico 5M pH:6:

Se prepara mezclando 286 ml de ácido acético glacial con 52,5 gr de hidróxido potásico y enrasando con agua destilada hasta 1 litro previo ajuste del pH a 6.

- Solución de fenol:

Se prepara fundiendo fenol sólido a 68°C al que se añade 8 hidroxiquinoleína hasta una concentración final del 0,1 %. El fenol fundido se extrae por decantación con Tris-ClH 1 M (pH:8) y después se realiza la misma operación con Tris-ClH 0,1 M (pH:8) hasta conseguir que el PH de la fase acuosa sea superior a 7,6. La solución de fenol se almacena a 4°C en frascos de color topacio.

- Sevag:

Es una disolución compuesta por 24 partes de cloroformo (Merck, ref. 2445) y una parte de alcohol isoamílico (Merck, ref. 979). Para un litro se mezclan 960 ml de cloroformo y 40 ml de alcohol isoamílico.

- Disolución madre de Ribonucleasa A:

Se prepara a una concentración de 10 mg/ml:
Ribonucleasa A (Boehringer ref 109169) 20mg
Tris-ClH 1M (pH:7,5) 20ul
ClNa 5M 6ul
en 2 ml de agua destilada.

MATERIALES

Centrifuga.

Tubos de policarbonato.

METODO

- Las bacterias se precipitan por centrifugación a 4.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tira el sobrenadante y se lavan con 100 ml de TSE frío.

- El botón bacteriano se resuspende en 10 ml de la solución alcalina de lisis I a la que se añade lisozima a una concentración de 5 mgr/ml. Posteriormente se trasfiere la suspensión a un tubo de policarbonato y se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- Se añaden 20 ml de la solución II, se tapa el tubo y se mezcla su contenido por agitación suave, dejándolo en hielo durante 10 minutos.

- Añadir 15 ml de la solución de acetato potásico 5M (pH:6) enfriada en hielo. Dejar durante 10 minutos la mezcla en hielo.

- Centrifugar a 20.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El DNA bacteriano y los restos celulares forman el precipitado.

- Recoger el sobrenadante y pasarlo a un tubo de vidrio.

- Extracción con fenol y sevag:

El sobrenadante se mezcla con fenol y sevag

a partes iguales y se centrifuga a 2.500 rpm durante 15 minutos.

- Recoger el sobrenadante y añadir 16 ml de alcohol isopropílico que precipita el DNA plasmídico. Centrifugar a 15.000 rpm durante 30 minutos.

- Decantar el sobrenadante y disolver el precipitado en 1 ml de TE con 10 ul de una solución de RNAasa de 10 ugr/ml.

- Dializar durante toda la noche en un tampón de TE.

II-8.1.2 AISLAMIENTO DE LA SONDA p II- β -3

La sonda p II- β -3 se encuentra inserta en el plasmido pBR322. Una vez que se ha aislado el plasmido se procede a su digestión con enzimas específicas de restricción. Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan puentes fosfodiéster internos de cadenas de polinucleótidos. Las enzimas de tipo II reconocen sitios de unión restringidos y específicos, produciendo la rotura en el mismo o en un lugar próximo al de reconocimiento.

Tras la digestión del plasmido se producen diversos fragmentos de DNA entre los que se encuentra la sonda. Mediante electroforesis sobre gel de agarosa se consigue separar la sonda de los otros fragmentos de DNA plasmídico. Finalmente se procede a eluir del gel de agarosa su contenido en el área donde se ha localizado la sonda.

II-8.1.2.1 Digestión del plásmico pII-beta-3 con las enzimas de restricción Sac I e Hind III.

REACTIVOS

- Enzimas de restricción:

	Tampón conc.salina	Tª de incubación	Secuencia que reconocen
Sac I (Amersham cod. T.1080z)	baja	37°C	GAGCT'C
Hind III (Amersham cod. T.1060z)	media	37-55°C	A'AGCTT

- Tampón de digestión: de baja fuerza ionica, no posee ClNa.

Tris-ClH (pH:7,5) 10 mM

Cl₂Mg (Merck, ref. 5833) 10 mM

Ditiotreitol (Sigma, ref. D 0632) 1 mM

Se filtra con filtros milipore de 0,45 um (Cat nº SLHA 025bs). Se almacena a 4°C durante 1 o 2 semanas o a -20°C indefinidamente.

- Solución de EDTA 0,5 M (pH:7,5):

186,1 g de EDTA

20 g de NaOH

H₂O hasta 1 litro previo ajuste del pH.

Se esteriliza en autoclave.

MATERIALES

Tubos Eppendorf

Puntas de pipeta

Pipetas automaticas regulables.

METODO

a) Digestión analítica:

Se utiliza para chequear el DNA plasmidico.

- Se colocan en un tubo Eppendorf 0,2 ug de DNA plasmídico en un volumen de 10 a 20 ul de agua destilada.

- Se añaden 1 o 2 ul del tampón apropiado 10x.

- Se añaden las enzimas.

- Incubación 2 horas a 37°C.

- Es recomendable que la proporción de enzima respecto al volumen final de reacción no sea muy alta, no superior al 15-20 % con objeto de evitar que el glicerol incluido en la solución enzimatica como anticongelante pudiera inhibir la reacción.

En caso de digestiones dobles o triples se utiliza el tampón de menor fuerza ionica. Todas las manipulaciones se deben realizar en baño de hielo para evitar la actuación precoz de la enzima.

b) Digestión preparativa:

La digestión preparativa se lleva a cabo después de haber chequeado el DNA plasmidico en la digestión analítica. Tiene como objeto conseguir la sonda. En este caso se aumentan la cantidad de DNA, el volumen de la digestión, y las soluciones enzimaticas y el tiempo de incubación.

- Se preparó una disolución de 40 ugr de DNA

plasmidico en 500 ul de agua destilada en un tubo Eppendorf esteril.

- Se añadieron a continuación, 60 ul del tampón 10x de digestión de fuerza ionica baja, 20 ul de la enzima SacI (100 unidades/ul) y 20 ul de la enzima Hind III (200 unidades/ul).

- Se dejó incubando la mezcla a 37°C durante 4 horas.

- La reacción se detuvo con EDTA 0,5 M (pH:7,5)

- Concluido el tiempo de incubación se realiza por norma una comprobación de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa empleando un minigel. De esta forma se puede saber si la digestión ha sido completa y también sirve para descartar una probable contaminación con exonucleasas.

II-8.1.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.

Tiene como finalidad separar los fragmentos de DNA en base a su tamaño. La velocidad de migración electroforetica de las moléculas de DNA es inversamente proporcional al logaritmo decimal de sus pesos moleculares, siempre que se trate de moléculas de DNA lineal.

La concentración del gel de agarosa es importante para obtener una buena separación de los fragmentos de DNA. Normalmente se emplea a una concentración del 0,6 %. En el caso de la electroforesis preparativa para la extracción de la sonda, el tipo de agarosa es especial de bajo punto de fusión y de mayor pureza que la agarosa tipo II, que gelifica a 30°C y funde a 65°C.

Para la visualización del DNA en los geles de agarosa se emplea el bromuro de etidio que posee un grupo planar que se intercala entre las pilas de bases del DNA. La radiación UV absorbida por el DNA a 260 nm y transmitida al colorante es emitida a 590 nm, en la región rojo-anaranjada del espectro visible.

REACTIVOS

Solución de bromuro de etidio (Sigma, ref. E-8751) 10 mg/ml.

Solución de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad, ref. 1620020) al 0,6 %.

Tampón 50x de electroforesis (TAE):

Tris	242	g
Acido acético glacial	57,1	ml
EDTA 0,5 M (ph:8)	100	ml

Agua hasta 1 litro.

Se esteriliza en autoclave.

Para su utilización se diluye 50 veces.

Tampón LB 10x (Loading Buffer):

Azul de bromofenol (Merck ref 8122)	0,125	ml
Xileno-cianol (Bio-Rad ref 161-0423)	0,125	ml
Ficoll tipo 400 (Pharmacia ref 17-0400-02)	12,5	ml
Agua	50	ml

MATERIALES

Placa de vidrio.

Cinta adhesiva de autoclave.

Peine de 6 pocillos (25 x 3 mm/pocillo).

Cubeta de electroforesis BRL modelo H4.

Fuente de alimentación.

METODO

- En primer lugar se preparó el gel. Para ello se emplearon 200 ml de una solución de agarosa al 0,6 %. La agarosa se disolvió por calentamiento a 50°C. El molde se confeccionó sobre una placa de vidrio cuyos bordes se acotaron con cinta adhesiva de autoclave. El molde se selló con una pequeña cantidad de agar y se colocó el peine.

Después de añadir 20 ul de la solución de bromuro de etidio y 4 ml de tampón de electroforesis, la solución de agar caliente se colocó en el molde. Se dejó enfriar durante 30-45 minutos y se retiraron la cinta adhesiva y el peine cuidando de no romper los pocillos.

- El gel se colocó en la cubeta de electroforesis que se llenó con tampón de electroforesis hasta que sobrecubriera el gel en 1 mm.

- La muestra de DNA plasmídico digerido con los enzimas de restricción se mezcló con 70 ul de tampón de carga (L3) y se repartió en 4 pocillos.

- Se conectó la cubeta a la fuente de alimentación y se dejó correr el gel a 4,5 v/cm durante 16 horas.

II-8.1.2.3 Extracción de la sonda pII- β -3 del gel de agarosa.

REACTIVOS

- Tampón de baja fuerza iónica:

ClNa 0,2 M

Tris-ClH (pH:7,5) 20 mM

EDTA 1 mM

- Tampón de alta fuerza iónica:

ClNa 1 M

Tris-ClH (pH:7,5) 20 mM

EDTA 1 mM

- Fenol

- Sevag

- Columna de hidroxapatita (Bio-Rad, RDP mini columns ref. nº 1620201)

- Acetato sódico 3 M

- t-RNA (Boehringer ref. 1214239)

- Etanol absoluto

MATERIALES

- Tubos Eppendorf

- Microfuga

- Desecador de vacío

- Fuente de luz ultravioleta 2,500 uW/cm²

- Transiluminador

METODO

- Realizada la electroforesis preparativa, la banda correspondiente a la sonda pII- β 3 se localizó al colocar el gel sobre el transiluminador y conectar la fuente de luz ultravioleta. Se cortó la porción de gel que contenía la sonda y se mezcló con 5 volúmenes de tampon de baja fuerza iónica. A continuación se fundió por calentamiento en un baño a 65°C durante 30 minutos.

- Se extrajo con un volumen igual de fenol recuperando la fase acuosa por centrifugación a 500 g a 20°C y posteriormente se volvió a extraer con un volumen igual de una mezcla de fenol-sevag. Finalmente se hizo una tercera extracción con un volumen igual de sevag.

- El DNA se obtuvo por medio de una columna de hidroxapatita. La columna previamente se preparó pasando a través de ella un tampón de alta fuerza iónica y 3 ml de tampón de baja fuerza iónica.

La fase acuosa de la extracción con sevag se pasó lentamente por la columna (gota a gota) y se lavó esta con 3 ml de tampón de baja fuerza iónica. Posteriormente, con el fin de desligar el DNA, se pasaron 400 ul de tampón de alta fuerza iónica, gota a gota, con una jeringuilla de insulina.

- Al eluido de la columna se le añadieron 3 ul de tRNA de una solución de 10 ug/ml para favorecer la precipitación del DNA. Posteriormente se añadieron 40 ul de AcNa 3 M y 800 ul de etanol absoluto con

objeto de precipitar el DNA y el tRNA. Se dejó precipitando a -20°C toda la noche.

- Se centrifugó 10 minutos en una microcentrifuga de alta velocidad para tubos Eppendorf, para recoger bien todo el precipitado que se lavó con 1 ml de etanol de 70 %, centrifugando otros 10 minutos en la misma centrifuga.

- Desechado el sobrenadante, se seco el precipitado en un desecador de vacío y posteriormente, se resuspendió en 12 μl de TE.

II-8.1.3 Linealización del plásmido que contiene la sonda Pdp001.

Para el estudio de los genes de clase I se empleó la sonda Pdp001 unida al DNA del plásmido PBR322. Previamente al marcaje con P^{32} se procedió a linealizar el plásmido. Se emplearon 300 μl de plásmido para la digestión con 30 μl de la enzima EcoRI en 30 μl del tampón de alta fuerza iónica. Se completó el volumen hasta 0,5 ml con 140 μl de agua destilada. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas.

Finalizada la digestión se efectuó una extracción del Pdp001 linealizado con fenol otra con fenol-sevag y otra con sevag. Para concluir se precipitó la sonda linealizada con acetato sódico 3 M y etanol. El precipitado se resuspendió en 50 μl de TE.

II-8.1.4 Marcaje isotópico con P^{32} de las sondas. (Rigby y cols., 1.977)

La enzima polimerasa I procedente de la cepa *Escherichia coli* añade nucleótidos a la porción terminal 3' hidroxil que se originan cuando una hebra de DNA bicatenario se rompe. Además, la enzima por su actividad 5'---- 3' exonucleasa puede quitar nucleótidos del lado 5' en la zona de rotura. La eliminación de nucleótidos de la zona 5' y la adición secuencial de nuevos nucleótidos en la zona 3' da como resultado un desplazamiento del área de rotura (Nick Translation) a lo largo del DNA. Sustituyendo los nucleótidos preexistentes con otros marcados radioactivamente, es posible preparar DNA marcado con P^{32} con una actividad específica superior a 10^8 cpm/ug.

MATERIALES

- DNA (Sondas: ρ II- β -3 y Pdp001)
- Solución 1: nucleótidos sin marcar, 2'desoxiadenosina, 5'trifosfato (d-ATP), 2'desoxicitidina, 5'trifosfato (d-CTP) y 2'desoxiguanidina, 5'trifosfato (d-GTP) en un tampón de Tris-ClH, Cl_2Mg y 2 mercapto etanol.
- Solución 2: Solución enzimática que contiene la DNAasaI y la DNA polimerasa I en un tampón de Tris-ClH, Cl_2Mg , glicerol y seroalbúmina bovina.
- Solución 3: nucleótido marcado, 2'desoxicitidina, 5' (α - P^{32}) trifosfato, sal trietilamónica de actividad 10 mCi/ml.

Las soluciones 1,2,3 vienen preparadas en un "kit" comercial de Amersham ref Nick Translation N 5,000.

- Sephadex G-50 medio (Pharmacia Fine Chemicals ref 17004302)
- Solución TE y solución TE con el 0,1 % de SDS
- Columna de propileno (Bio-Rad ref 731-1550)
- Matraz de vidrio
- Tubos Eppendorf
- Baño de hielo
- Líquido de centelleo: Solución de PPO en Toluol: 9 gr/litro
- Contador gamma

METODO

- En una cubeta de hielo sobre un tubo Eppendorf, se lleva a cabo la reacción con:

- 10 ul de las sondas pII- β -3 o Pdp001
- 20 ul de la solución 1
- 10 ul de la solución 3
- 10 ul de la solución 2
- 53,5 ul de H₂O

Se mezcla el contenido del Eppendorf agitandolo con suavidad y se realiza una centrifugación de 1 minuto en microfuga.

- Se deja incubando a 15°C durante 2 horas y después de ese tiempo la reacción se paraliza con 70 ul de TE-SDS al 0,1 %.

- A continuación se procede a separar el DNA

ClK	0,38 gr
Tris-base	3 gr
Rojo fenol	0,015 gr
H ₂ O	hasta 800 ml

- Se ajusta el pH a 7,4 con ClH 1 N y se añade agua hasta el litro.

MATERIALES

- Espatula
- Frascos de cultivo
- Frascos universales

METODO

Las células del melanoma M1 se cultivaron en monocapa. Antes de proceder a su recuperación se lavaron dos veces los frascos de cultivo con una solución de TBS fría. Las células del melanoma M1 se despegaron de los frascos de cultivo con una espátula adecuada empleando TBS. Se centrifugó la suspensión celular a 1.500 g durante 10 minutos a 4°C.

II-8.2.1.2 Aislamiento de los polimorfonucleares.

MATERIALES

- 50 ml de sangre periférica
- Ficoll de 1,077
- Ficoll de 1,901
- Heparina

- TBS
- Tubos de vidrio de 15 ml
- Pipetas Pasteur
- Tubos universales de 30 cc
- Centrífuga

METODO

- 50 ml de sangre periférica heparinizada, extraídos del paciente portador del melanoma M1, se mezclaron con 50 ml de TBS. La mezcla se repartió en tubos de 15 ml donde se habían colocado 3 ml de ficoll de densidad 1,901 y sobre estos tres de ficoll 1,077.

- Los tubos se centrifugaron a 2.500 rpm durante 30 minutos.

- Con una pipeta Pasteur se recogieron los halos situados entre los dos gradientes de ficoll. La suspensión de PMN se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C.

II-8.2.1.3 Extracción del DNA mediante lisis de las células del melanoma M1 y de los PMN. Según la técnica de Blin y Stafford, de 1.976.

MATERIALES

- Solución de lisis:

EDTA

0,5 M (pH:8)

Proteinasa K (Merck art nº24568) 100 ug/ml

- | | |
|----------|-------|
| Sarcosyl | 0,5 % |
|----------|-------|
- Solución de dialisis:

Tris-ClH (pH:8)	50 mM
EDTA	10 mM
ClNa	10 mM
 - Solución de DNAasa libre de RNAasa (Boehringer ref. 104132)
 - Fenol
 - Sevag
 - Solución TE

METODO

- Tanto las células del melanoma M1 como los PMN se ajustaron a una concentración de 10^8 células/ml en TE frío.

- Se añadieron 10 volúmenes de la solución de lisis.

- Las suspensiones con las células lisadas se dejaron durante 3 horas en un baño de 50°C agitando periódicamente.

- Se realizó la extracción de DNA con un volumen igual de fenol por tres veces. Después de centrifugar, el fenol generalmente forma la fase superior, en estas extracciones, debido a la concentración salina tan alta de la muestra. Se retiró el fenol y la interfase.

- Después de la tercera extracción con fenol,

las muestras se dializaron frente a cuatro litros de la solución de diálisis, hasta conseguir que los dializados tuvieran una DO_{270} inferior a 0,05. Se dejó espacio suficiente en las bolsas de diálisis para que las muestras aumentaran tres veces de volumen.

- Se trataron las muestras de DNA de melonoma y de PMN con 100 ug/ml cada una de la solución de RNAasa libre de DNAasa a 37 °C durante 3 horas.

- Se realizaron dos extracciones de las muestras con sevag.

- Finalmente se dializaron frente TE y se dejaron a 4 °C.

- Para aumentar la concentración de DNA, las muestras se precipitaron con 1/10 de su volumen, de una solución de acetato sódico 3 M pH 5,2 y con un volumen de etanol al 95 % dos veces superior. Se recogieron los precipitados y cada uno de ellos se disolvió con 1 ml de TE.

II-8.2.2 Cuantificación de DNA

Se han utilizado alternativamente dos en la medición de la cantidad de DNA de una preparación.

Si la muestra es pura (por ejemplo, sin

cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa y otros ácidos nucleicos) la medición por espectrofotometría de la cantidad de luz U.V. absorbida por las bases, es un método simple y exacto.

Si la cantidad de DNA es muy pequeña, o si la muestra contiene significativas cantidades de impurezas, la cantidad de ácidos nucleicos puede ser estimada por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio comparado con patrones.

1) Determinación espectrofotométrica del DNA.

Para cuantificar la cantidad de DNA se toman lecturas de longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura de 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una absorbancia $OD = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA.

La relación entre la lectura de 260 nm y 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) proporciona una estimación de la pureza de ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen OD_{260}/OD_{280} de 1,8 a 2,0.

Si hay contaminación con proteínas o fenol el OD_{260}/OD_{280} sería significativamente inferior que los valores dados anteriormente y la cuantificación

exacta de la cantidad de ácidos nucleicos no sería posible.

El volumen mínimo de muestra es de 300-600 ul. Para el DNA de plásmicos es conveniente medir una dilución 1:25 a 1:50.

La concentración de DNA sería igual al producto $A_{260} \times 50$ ug/ml siempre que la relación A_{260}/A_{280} sea mayor o igual 1,5.

2) Determinación del DNA con bromuro de Etidio.

Algunas veces no hay suficiente DNA (250ng/ml) para la prueba espectrofotométrica o, el DNA puede estar contaminado con sustancias de distinta absorción U.V. que impiden un análisis exácto. Un camino rápido para estimar la cantidad de DNA en tales casos, es utilizar la cantidad de fluorescencia emitida a U.V. por la moléculas de bromuro de etidio intercaladas dentro del DNA, ya que la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la masa total de DNA. La cantidad de DNA en la muestra puede ser estimada por comparación de la fluorescencia producida por la muestra con una serie de muestras standard. Cantidades tan pequeñas como 1-5 ngr pueden ser detectadas por este método.

Se prepara una placa de Petri con agarosa

más Bromuro de Etidio (1 ugr/ml) y en la superficie se deposita 1 ul de la muestra de DNA y 1 ul de la solución standard a distintas concentraciones. Se deja secar y se lleva al transiluminador y se hace una fotografía. Por comparación de la fluorescencia emitida por la muestra en estudio y las distintas soluciones standard calculamos aproximadamente la concentración de DNA de la muestra.

II-8.2.3 Digestión con enzimas de restricción para Blotting.

Se emplea para tratar el DNA eucariota antes de la electroforesis y de la transferencia a filtro de nitrocelulosa. La digestión del DNA se produce al incubarlo con una cantidad suficiente de enzima en las condiciones marcadas por el fabricante. Cada enzima requiere un determinado tampón. El tampón se puede preparar o bien utilizar uno comercial. Las enzimas que se utilizaron fueron: EcoRI, Pvu II y Hind III que actúan en el tampón E8 (Amersham) y la enzima Pst que necesita el tampón E5 (Amersham).

Las digestiones se llevaron a cabo teniendo en cuenta las siguientes condiciones generales:

- El volumen total de digestión no ha de ser inferior a 10 ul.
- El volumen del tampón debe ser el decimo del total.
- El volumen de preparación enzimática no puede superar el 10 % del volumen total.
- La cantidad de DNA eucariota oscila entre

10 y 20 ug y las unidades de las enzimas entre 100 y 150 en un volumen máximo de 50 ul. Por tanto la concentración mínima de DNA eucariota a utilizar será de 250-300 ug/ml y la concentración mínima de las enzimas de 20-30 u/ml.

METODO

- En tubos Eppendorf se colocan por orden las cantidades requeridas de: Agua, tampón, DNA y enzima.

- Agitar en vortex, muy ligeramente y centrifugar unos segundos en microfuga.

- Incubar 4 horas a 37°C.

Para la digestión del DNA de las células del melanoma M1 y del DNA de los PMN autólogos se empleó el siguiente protocolo:

	Agua	DNA	Enzima	Tampón
M1	28 ul	20 ul	EcoRI 6 ul	E8 6 ul
PMN	28 ul	20 ul	EcoRI 6 ul	E8 5 ul
M1	20 ul	20ul	PvuII 5 ul	E8 5 ul
PMN	20 ul	20ul	PvuII 5ul	E8 5 ul

En este caso se estudiaron los genes de clase II. Para el estudio de lso genes de clase I se aplicó el siguiente protocolo:

	Agua	DNA	Enzima	Tampón
M1	28 ul	20 ul	BamH-I 6 ul	E6 6 ul
PMN	28 ul	20 ul	BamH-I 6 ul	E6 6 ul

	Agua	DNA	Enzima	Tampón
M1	20 ul	20 ul	PVuII 5 ul	E8 5 ul
PMN	20 ul	20 ul	PVuII 5 ul	E8 5 ul
M1	20 ul	20 ul	PstI 5 ul	E5 5 ul
PMN	20 ul	20 ul	PstI 5 ul	E5 5 ul

II-8.2.4 Electroforésis en gel de agarosa (Helling y cols., 1.974).

REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Agarosa tipo II (Sigma, ref. A-6877)
- Solución de bromuro de etidio.
- Tampón de carga 10 x LB.
- Tampón de electroforésis 50 x.
- Marcadores de peso molecular: III-DNA de Fago Lambda digerido con EcoRI y Hind-III (Boehringer, ref. 528552).

MATERIALES

- Molde para gel.
- Cinta adhesiva.
- Peine para pocillos.
- Cubeta para electroforesis.

METODO

- Se preparan 200 ml de solución de agarosa tipo II al 0,6 % que se disuelve calentandola hasta la ebullición.

- El molde se prepara sobre el porta-geles acotandolo con cinta adhesiva. Cuando se ha enfriado la disolución de agarosa hasta 50°C se le añaden 4 ml de tampón de electroforesis 50x y 20 ul de la solución de bromuro de etidio. Se vierte a continuación sobre el molde donde se deja que solidifique.

- El gel se coloca en una cubeta de electroforesis que se llena con el tampón de electroforesis hasta que el gel quede cubierto.

- Las muestras se preparan añadiendo tampón 10xLB en una proporción del 10 % del volumen total y después de una ligera agitación seguida de una breve centrifugación se cargan en los pocillos.

- La cubeta se conecta a la fuente de alimentación y se deja correr el gel a 4,5 v/cm durante 10 horas.

II-8.2.5 Transferencia a papel de nitrocelulosa.

MATERIALES

- Solución 1:

ClNa 1,5 M

NaOH 0,5 M

- Solución 2:

Tris-ClH (pH:8) 1 M

ClNa 1,5 M

- Tampón de transferencia 10x SSC:

ClNa 87,6 g

Citrato sódico 44,2 g

Agua hasta 1 litro

pH 7

- Papel Whatman 3 MM
- Papel de nitrocelulosa tipo HAH-4 Millipore ref. HAH4 304FO
- Papel de filtro adsorbente para blotting Bio-Rad ref. 162-0118
- Baño
- Estufa con sistema de vacío

METODO

- Después de concluir la electroforesis se se lleva el gel al transiluminador y se realiza una fotografía para comprobar si el desplazamiento de las diversas bandas de DNA es correcto.

- Se coloca el gel, para desnaturalizar el DNA, en un baño con varios volúmenes de la solución 1, durante una hora a temperatura ambiente y con agitación continua mediante un imán.

- El gel se neutraliza con la solución 2 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación continua.

- Se corta una pieza de papel Whatman 3 MM de dimensiones mayores que el gel y se coloca sobre un soporte situado dentro de una cubeta. La cubeta se llena con el tampón 10x SSC de forma que no llegue el nivel del líquido a rebasar el soporte pero que permitiera empapar los extremos del papel Whatmann 3 MM. Se eliminan las burbujas de aire con una varilla de

cristal.

- El gel se invierte y se coloca sobre el papel 3 MM humedecido, evitando la formación de burbujas de aire.

- Se corta una pieza de papel de nitrocelulosa de dimensiones superiores en 2 mm a las del gel. Para manejar el filtro de nitrocelulosa se deben utilizar guantes.,

- El filtro de nitrocelulosa se coloca en un baño de 2x SSC durante 3 minutos.

- El filtro de nitrocelulosa humedecido se situa sobre el gel y se cubre con dos piezas de papel Whatmann 3 MM de dimensiones iguales a las del gel y previamente humedecidas con el tampón 2x SSC.

- Se cortan papeles de filtro absorbente para formar un bloque de 5-8 cm de alto y de base menor a la superficie de los papeles Whatmann sobre los que se situaron. El bloque se cubre con una pieza de vidrio y finalmente se coloca un peso de 500 g.

El objetivo es establecer una corriente de líquido desde le baño que pase a través del gel y del filtro de nitrocelulosa de forma que los fragmentos de DNA eluidos del gel se situen en el filtro de nitrocelulosa.

- Se realiza la transferencia durante 18 horas. Se recogen el gel y el filtro y se sitúan con gel orientado hacia arriba entre piezas de papel Whatmann

3 MM secos. Se marcan los límites del gel sobre el filtro con un lápiz y posteriormente el gel se despega del filtro.

- El filtro se coloca sobre un baño con tampón 6x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Después de escurrir el exceso de líquido se deja secar a temperatura ambiente dentro de unas cubiertas de papel Whatmann 3 MM. Finalmente el filtro seco se coloca dentro de la estufa de vacío durante 2 horas a 80°C.

II-8.3 HIBRIDACION

MATERIALES

- Sonda p11-~~A~~-3 marcada con P³²

- DNA de melanoma y PMN

- Solución A:

ClNa 5,8 g

Formamida desionizada (Merck art nº9684)
50 ml.

Dextran sulfato al 50 % (Pharmacia fine
chemicals ref 17-034002) 20 ml.

Tris 3 M pH:7,4 1,65 ml

Pirofosfato tetrasódico 10 H₂O (Sigma ref.
P-9146) 1 ml

Esperma de salmón fragmentado 1.5 ml
a una concentración de 10 mg/ml.

SDS al 10% 10 ml que se añaden al final de
la mezcla de las soluciones A y B.

- Solución B 50x Denhart:
 - Ficoll tipo 400 1 %
 - Polivinilpirrolidona 1 %
 - Albúmina bovina 1 %
- Solución 20x SSC:
 - ClNa 3 M
 - Citrato sódico 0,3 M (pH:7)
- Solución 3x SSC, SDS 0,1 %: Se prepara mezclando
 - 150 ml de solución 20x SSC
 - 10 ml de solución SDS al 10 %
 - agua destilada hasta 1 litro.
- Solución 0,3x SSC, SDS 0,1 %: se mezclan
 - 15 ml de solución 20x SSC
 - 10 ml de solución SDS al 10 %
 - Agua destilada hasta 1 litro
- Solución 0,1x SSC, SDS 0,1 %: se mezclan
 - 5 ml de solución 20x SSC
 - 10 ml de solución SDS al 10 %
 - Agua destilada hasta 1 litro
- Cilindros para el filtro
- Estufa de incubación con rotor.

METODO

- El filtro después de la transferencia se humedece en la solución 3x SSC y se coloca en el cilindro. Después de quitar las burbujas de aire se

añaden 7,5 ml del tampón de hibridación.

- El tampón de hibridación se prepara mezclando

- 5,25 ml de la solución A

- 1,20 ml de la solución B

- 0,75 ml de SDS al 10 %

- El cilindro que contiene el filtro y el tampón de hibridación se situa en el rotor de la estufa y se deja girando 24 horas a 43 °C.

- A continuación se añade la sonda marcada con P^{32} y 70 ul de DNA humano como transportador ("carrier"). Se deja incubar durante 48 horas en rotación a 43 °C.

El DNA humano que actua como "carrier" se prepara calentandolo 5 minutos en ebullición y enfriandolo posteriormente 2 minutos en hielo.

- Posteriormente se procede a los lavados. Se realizaron 2 de 15 minutos a 65°C con la solución 3x SSC, otros dos con la solución 0,3x SSC y otros dos con la solución 0,1x SSC en las mismas condiciones.

- El filtro se seca a temperatura ambiente sobre papeles Whatmann 3 MM y posteriormente se coloca en un chasis con una pelicula de Rayos X para la autoradiografía.

II-9 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Relacionamos la expresión de antígenos HLA de Clase I y II en las células del MM con los demás parámetros clínicos e histológicos.

.a. Estadística descriptiva: Se calculó la media (\bar{X}) y desviación standard (D.E) para las variables de la muestra de tipo continuo (tiempo de evolución, etc.) y los porcentajes y frecuencias correspondientes a las variables discontinuas.

.b. Análisis Estadístico: Se empleó la Prueba Exacta de Fisher para contraste de dos proporciones, para estudiar la significación de las diferencias encontradas en las frecuencias de variables discontinuas. Nos establecemos un nivel de significación de $p = 0.05$. El test de Student para muestras independientes, para analizar la significación de las diferencias encontradas en las medias aritméticas de variables contínuas ($p 0.05$).

RESULTADOS

III-1 DESCRIPCION DE LA MUESTRA. GRAFICAS. Anexo 1

Nuestra muestra formada por 27 pacientes con MM primitivo y 32 pacientes con MM metastásico. En cada uno de los grupos, obtenemos los siguientes factores de pronóstico:

A.- Obtenidos por la exploración

A.1.- MM primitivos:

Sexo: Dos tercios de nuestra muestra fueron mujeres (Fig. 1).

Edad: La X de edad, fué de 50.67 +/- 12.55 para los hombres y de 50.56 +/- 15.29 en mujeres, con un máximo de 72 y un mínimo de 25 (Fig. 2).

Localización: La mayoría de los MM se localizaron en extremidades inferiores y cabeza (Fig. 3).

Forma anatomoclínica: Predominan los SSM, seguidos de LLM (Fig. 4).

Tamaño del tumor: Las dimensiones medias de nuestros tumores fué de 2.73 cm +/- 2.17. Dada la gran dispersión de la muestra, excluimos esta variable de nuestro estudio.

Pigmentación: Sólo dos MM fueron amelanóticos; los demás estaban pigmentados (Fig. 5).

Caracteres fenotípicos: Predominan individuos de piel blanca, ojos claros y cabello claro (Figs. 6, 7 y 8).

Número de nevus: La mayoría tenían más de 20 nevus (Fig. 9).

Presencia de precáncer y cáncer cutáneo: Sólo en 4 pacientes se asoció precáncer cutáneo, en uno con Carcinoma Espinocelular del labio inferior y en otro un segundo MM. Dada la escasez de la muestra excluimos esta variable de nuestro estudio (Figs. 10 y 11).

Termografía: Algo más de la mitad presentaron termogramas "benignos" fríos, isotérmicos o hipertermia inferior a 1°C. La cuarta parte, tuvieron hipertermias superiores a 2°C (Fig. 12).

A.2.- MM metastásicos:

Sexo: Un 53 % de nuestra muestra fueron varones (Fig. 13).

Edad: La X de edad, fué de 47.21 +/- 18.27 con un máximo de 79 y un mínimo de 1 (Fig. 14).

Localización: Nuestra muestra está constituida por 19 Metástasis Ganglionares y 13 Metástasis Cutáneas (Fig. 15).

La localización más frecuente de las Metástasis Ganglionares es la región inguinal, seguida

de la axilar y cervical (Fig. 16).

Las Metástasis Cutáneas predominan las localizadas en la cabeza (7), seguida de tronco (3) y extremidades inferiores (2) (Fig. 17).

La mayoría de los MM primitivos de dichas metástasis se localizaron en tronco y extremidades inferiores (Fig. 18).

Forma anatomoclínica del MM primitivo:
Predominan los SSM, seguidos de MN (Fig. 19).

Pigmentación del MM primitivo: Predominan los MM pigmentados (Fig. 20).

B.- Obtenidos por la Historia Clínica

B.1.- MM primitivos:

Tiempo de evolución: El tiempo de evolución medio, antes de consultar, fué de 5.15 años +/- 5.26. Al encontrar una dispersión tan grande, desechamos esta variable.

Historia de exposición al sol: Sólo el 30 % de nuestros pacientes manifestaron no exponerse al sol, ni siquiera de forma ocasional. Sólo recibieron el "sol de acera". De los expuestos, casi la mitad lo hacían de forma intermitente, con fines recreativos no profesionales (Fig. 21).

Antecedentes familiares: Los antecedentes

familiares de diabetes, se presentan en un número muy reducido de pacientes. Sí son más frecuentes los antecedentes familiares de MM que de cáncer cutáneo no melanoma, aunque la muestra es muy reducida. No incluimos esta variable en nuestro estudio (Fig. 22).

Estadío evolutivo: Predominan los MM en estadio I (Fig. 23).

B.2.- MM metastásicos

N.E.D. ó Tiempo libre de Metástasis: La media de tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor primitivo hasta la aparición de la metástasis fué de 17.9 +/- 23.8 meses, con un máximo de 96 y un mínimo de 1.

A.W.D. ó Tiempo de supervivencia: La media del tiempo transcurrido desde la aparición de la metástasis hasta el exitus fué de 16.5 +/- 18 meses, con un máximo de 72 y un mínimo de 2.

Estadío evolutivo: Predominan en nuestra muestra los MM en estadio III (Fig. 24).

C.- Factores de histopronóstico

C.1.- MM primitivos:

Espesor del tumor (Breslow): En el 30 % de los pacientes, el MM medía más de 3 mm (Fig. 25).

Nivel de invasión (Clark): En la misma proporción, las células tumorales invadían por debajo de la dermis profunda e hipodermis (Fig. 26).

Infiltrado: Predomina el infiltrado moderado e intenso (Fig. 27).

Ulceración: El 33 % de los MM estaban ulcerados (Fig. 28).

Citología: Predomina la citología globocelular. No encontramos ningún MM fusocelular y sólo hay un MM con citología mixta (Fig. 29).

Mitosis: Predominan los tumores con actividad mitótica escasa (Fig. 30).

C.2.- MM metastásicos:

Citología: En las metástasis, independientemente de la localización, predomina la citología globocelular, y solamente encontramos dos MM metastásicos de citología fusocelular y dos de citología mixta (Fig. 31).

Mitosis: Predominan los MM metastásicos con actividad mitótica moderada e intensa (Fig. 32).

Espesor del tumor primitivo: En el 54 % de los pacientes el MM primitivo medía más de 3 mm (Fig. 33).

Nivel de Clark del tumor primario: Predominan los MM primitivos con nivel III y IV (Fig. 34).

Ulceración del tumor primitivo: El 68.7 % de los MM primitivos estaban ulcerados (Fig. 35).

Citología del tumor primitivo: Predomina la citología globocelular y solamente 4 MM primitivos presentaban citología mixta (Fig. 36).

Mitosis del tumor primitivo: Predominan los MM primitivos con actividad mitótica escasa y moderada (Fig. 37).

Las características histológicas del tumor primitivo solo se conocían en 26 pacientes con MM metastásicos.

III-2 EXPRESION DE ANTIGENOS HLA. GRAFICAS. Anexo 2

A.- MM primitivos

HLA-CLASE I: En 3 tumores, no detectamos expresión de antígenos de clase I (Foto 1b), y en otros 5 tumores sólo menos del 25 % de células lo expresaron (Foto 1a). En 5, se expresaron moléculas de clase I entre el 50 y 75 % de las células del melanoma y en la mayoría, 14 tumores, todas las células los expresaron (Foto 2) (Fig. 38).

HLA-CLASE II: La mayoría, 21 tumores, no expresaron moléculas de clase II. En uno, apareció expresión en menos del 25 % de sus células, en 4 entre el 25 y 50 % (Foto 3a) y en uno, en más del 50 % (Foto 3b). No encontramos ningún tumor que expresara clase II en todas sus células (Fig. 39).

B.- MM metastásicos

HLA-CLASE I: En la mitad de los melanomas metastásicos no detectamos expresión de antígenos de clase I (Foto 4) y en 2 tumores sólo menos del 25 % de células lo expresaron. En 7 melanomas la expresión de moléculas de clase I se produjo en el 50-75 % de las células y en los 7 restantes todas las células fueron positivas (Fig. 40). (Fotos 5a y 5b, respectivamente).

HLA-CLASE II: En algo más de la mitad de las metástasis de melanoma no detectamos expresión de antígenos de clase II (Foto 6). En 10, hubo expresión entre el 25-50% de sus células (Foto 7) y en 3, entre el 50-75 %. No encontramos ningún tumor que expresara antígenos de clase II en todas sus células (Fig. 41).

III-3 RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO. TABLAS. Anexo 3

Cada una de las variables estudiadas, la relacionamos con la expresión de moléculas HLA de Clase I y II, obteniendo los siguientes resultados:

A.- Con las variables obtenidas por la exploración

A.1.- MM primitivos:

Sexo: (Tabla 1). La expresión de HLA, tanto de Clase I como de Clase II por las células de MM, es independiente del sexo.

Al no encontrar diferencias, no realizamos estudio estadístico.

Edad (Tabla 2). Solo el 65 % de los tumores de pacientes con edad igual o inferior a 65 años, expresaron clase I, mientras que todos los tumores de enfermos mayores de 65 años los expresaron. No obstante, las diferencias no son estadísticamente significativas (P.E. de Fischer).

Por el contrario, sólo el 22 % de los tumores de pacientes de edad igual o inferior a 65 años expresaron clase II y no lo hizo ninguno de mayor edad. Las diferencias no son estadísticamente significativas (P.E. de Fischer).

Localización (Tabla 3). Comparada la expresión de clase I entre los MM de cabeza y extremidad inferior, localizaciones más frecuentes en nuestra serie, es más frecuente en los tumores de cabeza, aunque las diferencias no son significativas (P.E. de Fischer).

No encontramos diferencias en la expresión de moléculas de clase II.

Forma anatomoclínica (Tabla 4). No encontramos ninguna relación. La forma anatomoclínica parece no influir en la expresión de antígenos HLA de clase I y II por las células del tumor.

Pigmentación (Tabla 5). No apreciamos diferencias.

Características fenotípicas:

Color de ojos (Tabla 6). No encontramos diferencias.

Color de pelo (Tabla 7). No encontramos diferencias.

Color de la piel (Tabla 8). No encontramos diferencias.

Número de nevus (Tabla 9). En los MM de los pacientes que tienen menos de 20 nevus, el 86 % expresan clase I, mientras que sólo el 65 % de aquellos que tienen más de 20 nevus lo hacen. Las diferencias no son significativas (P.E. de Fischer).

La expresión de las moléculas de clase II sólo se produce en aquellos pacientes que tienen más de 20 nevus, aunque las diferencias no son significativas (P.E. de Fischer).

Termografía (Tabla 10). El 93 % de MM con Termogramas benignos expresaron clase I, mientras que sólo lo hicieron el 29 % de los que tenían termogramas "malignos". Las diferencias son significativas ($p = 0.008$) (P.E. de Fischer).

La mayoría (93 %) de los tumores que no expresaron clase II, presentaron termogramas benignos, aunque la p está por debajo del límite establecido ($p = 0.2$) (P.E. de Fischer).

A.2.- MM metastásicos:

Sexo (Tabla 11). La expresión de antígenos HLA clase I y clase II por las células de los MM metastásicos, es independiente del sexo. Al no encontrar diferencias, no realizamos estudio estadístico.

Edad (Tabla 12). Con un margen de error del 2 % ($p = 0.02$) podemos decir que las metástasis de MM en individuos de menos de 50 años no van a expresar moléculas de clase I y que la mayoría de las metástasis en individuos de más de esta edad lo van a expresar (P.E. de Fischer).

La expresión de clase II por las células de las metástasis es independiente de la edad del paciente.

Localización. Al comparar la expresión de clase I entre metástasis ganglionares y cutáneas no encontramos diferencias significativas.

En cuanto a la expresión de moléculas de clase II podemos decir que es más frecuente en Metástasis Ganglionares que en Metástasis Cutáneas con un margen de error del 9 %. Las diferencias no alcanzan el nivel de significación que nos marcamos ($p = 0.09$) (P.E. de Fischer) (Tabla 13).

La expresión de clase I y clase II es independiente de las diferentes localizaciones ganglionares y cutáneas de las metástasis (Tablas 14 y 15).

Localización del tumor primitivo (Tabla 16). La expresión de antígenos HLA de clase I y clase II en las metástasis cutáneas y ganglionares de melanos, es independiente de la localización del tumor primitivo.

Forma anatomoclínica del tumor primitivo. (Tabla 17). En general, la forma clínica del tumor primitivo no influye de forma significativa en la expresión de moléculas HLA en las metástasis, pero con un margen de error del 4 % podemos afirmar que las metástasis de los SSM expresan con mayor frecuencia clase II que las del MN (P.E. de Fischer).

Pigmentación del tumor primitivo. (Tabla 18). No influye en la expresión de moléculas HLA de clase I y clase II de las Metástasis.

B.- Con las variables obtenidas por la Historia Clínica

B.1.- MM primitivos:

Tiempo de evolución. (Tabla 19). El tiempo de evolución medio fué de 5.15 años. No encontramos diferencias en la expresión de antígenos HLA en tumores con mayor o menor tiempo de evolución.

Historia de exposición al sol. (Tabla 20). No apreciamos diferencias en cuanto a la expresión de moléculas de clase I.

Por el contrario, en el 100 % de los pacientes que no se exponen al sol, su MM no expresó antígenos

HLA de clase II, mientras que sólo el 74 % de los que sí se exponen al sol, no lo expresaron (P.E. de Fischer).

Estadio evolutivo. (Tabla 21). El 80 % de los pacientes que consultaron en estadio I, su MM expresó antígenos HLA de clase I, mientras que sólo el 33 % de los MM de pacientes en estadio II los expresaron. Las diferencias no alcanzan el nivel de significación que nos marcamos ($p = 0.08$).

No encontramos diferencias en cuanto a la expresión de moléculas de clase II.

B.2.- MM metastásicos:

N.E.D. (Tabla 22). No encontramos diferencias en la expresión de antígenos HLA con respecto al tiempo libre de metástasis.

A.W.D. (Tabla 23). No apreciamos diferencias significativas entre la expresión de antígenos HLA y tiempo de supervivencia.

Estadio evolutivo (Tabla 24). Con un margen de error del 4 % ($p = 0.04$), podemos afirmar que los pacientes con MM en estadio III no expresan antígenos HLA de clase I, y que la mayoría de los MM en estadio II lo expresan (P.E. de Fischer).

En cuanto a la expresión de moléculas de clase II, el 63 % de los MM en estadio II expresaron y solamente el 33 % en estadio III. Las diferencias no son significativas.

C.- Con los Factores de Histopronóstico

C.1.- MM primitivos:

Espesor de Breslow (Tabla 25). Solo el 11 % de los MM con espesor de Breslow inferior a 3 mm no expresaron clase I, mientras que el 75 % de los más gruesos de 3 mm no expresaron. El 89 % de los MM con espesor inferior a 3 mm expresaron clase I y sólo el 25 % de espesor superior a 3 mm lo hicieron. Esta relación, Breslow-Expresión de clase I es significativa, con $p = 0.004$ (P.E. de Fischer).

Sólo el 6 % de los MM con espesor inferior a 3 mm expresaron clase II, mientras que en el 40 % de los más gruesos aparecieron antígenos de clase II. Esta relación, Breslow-Expresión de antígenos de clase II, no alcanza los niveles de significación que nos marcamos ($p = 0.09$) (P.E. de Fischer).

Nivel de Clark (Tabla 26). Todos los MM con niveles de invasión inferior a III expresan clase I, mientras que sólo el 22 % con niveles superiores a III expresan clase I ($p = 0.0037$) (P.E. de Fischer). El 90 % de los tumores nivel III expresan clase I, mientras que sólo el 22 % con niveles IV y V los expresan ($p = 0.0097$) (P.E. de Fischer). Por lo tanto existe una relación inversa entre el nivel de invasión y la expresión de clase I.

En la relación nivel de Clark-Expresión HLA de clase II, se mantiene la misma tendencia, aunque en sentido inverso, pero nos encontramos niveles

de significación estadística, posiblemente por lo reducido de la muestra.

Ulceración (Tabla 27). El 56 % de los MM ulcerados expresaron clase I, mientras el 78 % de los no ulcerados, también lo expresaron. Aunque las diferencias no son significativas, la presencia de ulceración parece disminuir las posibilidades de expresión de clase I.

No encontramos diferencias con clase II.

Infiltrado (Tabla 28). Todos los MM, clase I negativos, tenían un infiltrado escaso, mientras que todos los pacientes clase I positivos tenían un infiltrado importante. Diferencia muy significativa, con un margen de error igual a uno por cien mil casos ($p = 0.00001$) (P.E. de Fischer).

La mitad de los MM con infiltrado peritumoral escaso, no expresaron moléculas de clase II y en aquellos que tenían un infiltrado mayor, no se expresó clase II en el 95 %. Las diferencias son significativas ($p = 0.03$) (P.E. de Fischer).

Citología (Tabla 29). No encontramos relaciones con la citología.

Mitosis (Tabla 30). No encontramos relación entre la actividad mitótica del tumor y la expresión HLA.

C.2.- MM metastásicos:

Citología (Tabla 31). No encontramos relación entre la citología de la metástasis y la expresión HLA.

Actividad mitótica (Tabla 32). El número de mitosis por campo en las metástasis ganglionares o cutáneas, no influye en la expresión de moléculas HLA de clase I y clase II.

Características histológicas del tumor primario.

Espesor de Breslow (Tabla 33). La expresión de antígenos HLA de clase I y clase II en las células del MM metastásico es independiente del espesor del tumor primitivo.

Nivel de Clark (Tabla 34). La expresión de antígenos HLA de clase I y clase II en las células de las metástasis, es independiente del nivel de Clark del tumor primitivo.

Ulceración (Tabla 35). No hay relación entre la ulceración del melanoma primitivo y la expresión HLA de sus metástasis.

Citología (Tabla 36). Las características citológicas del MM primitivo no influye en la expresión HLA de sus metástasis.

Actividad mitótica (Tabla 37). El número de mitosis por campo en el tumor primitivo, en nuestra muestra, influye en la expresión de moléculas de

clase II de las metástasis, de forma que podemos decir con un margen de error del 2 %, que la expresión de moléculas de clase II es más frecuente en las metástasis de aquellos melanomas primitivos que tuvieron una actividad mitótica escasa que en los que presentaron una actividad mitótica moderada.

No encontramos diferencias en cuanto a la expresión de moléculas de clase I.

D.- Relación entre Expresión HLA en Melanomas Primitivos y Melanomas Metastásicos (Tabla 38). La expresión de moléculas HLA de clase I es más frecuente en MM primitivos (70 %) que en MM metastásicos (44 %), con un margen de error del 7 %. Las diferencias no alcanzan el nivel de significación que nos marcamos ($p = 0.07$) (P.E. de Fischer).

En cuanto a la expresión de moléculas HLA de clase II, es más frecuente en MM metastásicos (41 %) que en MM primitivos (18 %), pero no encontramos niveles de significación estadística.

III-4.- ANÁLISIS DE LA LÍNEA DE MELANOMA M1

- 1) Características de la línea M1.
- 2) Estudio fenotípico.
- 3) Análisis inmunoquímico.
- 4) Inducción de la expresión de las moléculas HLA de clase I y II con γ -Interferón.
- 5) Estudio de los genes de clase I y II.

1) Características de la línea M1.

La línea M1 se obtuvo a partir de una metástasis ganglionar de un melanoma. Las células eran adherentes y no estaban pigmentadas (Foto 8). Por microscopía electrónica se comprobó la presencia de melanosomas en su citoplasma. (Foto 9).

2) Estudio fenotípico.

El estudio fenotípico de las moléculas HLA de clase I y HLA-DR en la línea M1 se realizó con la técnica de radiounión. En la tabla 39, se reflejan los valores obtenidos. La línea M1 era negativa para HLA-ABC y HLA-DR.

3) Análisis inmunológico.

Con la técnica de inmunoprecipitación y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida no se detectó ninguna banda con el anticuerpo monoclonal GRH1 en la línea M1 (Foto 10). De esta forma se confirmaron los datos del estudio fenotípico en el sentido de que la línea M1 era negativa para HLA clase I (HLA-A, B, C).

4) Inducción de la expresión de las moléculas HLA de clase I y II con γ -Interferón.

La línea M1 tras el tratamiento con γ -Interferón expresó las moléculas HLA de clase I y HLA-DR. En la tabla 40, se recogen los valores obtenidos con la técnica de radiounión antes y después de la inducción con γ -Interferón.

5) Estudio de los genes de clase I y II.

Mediante la técnica de Southern Blot se compararon los patrones de bandas de los genes de clase I y HLA-DR β de la línea M1 con linfocitos autologos de sangre periférica, no encontrándose diferencias (Fotos 11 y 12).

T A B L A 39

EXPRESION DE HLA-CLASE I Y HLA-DR EN LA LINEA M1

	HLA-CLASE I	HLA-DR
M1	590 \pm 45	254 \pm 17
LLC	18.852 \pm 461	11.719 \pm 936
K562	489 \pm 38	198 \pm 26

Se empleó la técnica de radiounión, realizando cada ensayo por triplicado. Las cifras se corresponden con la media de las cuentas por minuto obtenidas en cada ensayo.

LLC: Células de una leucemia linfática crónica. Control positivo para la expresión de HLA-CLASE I y HLA-DR.

K562: Línea celular procedente de una eritroleucemia. Control negativo.

T A B L A 40

EFEECTO DEL γ -IFN EN LA EXPRESION DE HLA DE
CLASE I Y DR EN LA LINEA M1

	HLA-CLASE I		HLA-DR	
	SIN IFN	CON IFN	SIN IFN	CON IFN
M1	313 \pm 30	25.119 \pm 643	197 \pm 35	27.638 \pm 4.823
KM3	71.197 \pm 2.198	--	66.099 \pm 35	--

Cada ensayo se realizó por triplicado con 1×10^6 células. Las cifras se corresponden con la media de las cuentas por minuto obtenidas en cada ensayo con la técnica de radiounión. La dosis de γ -IFN fué de 50 U/ml. La línea KM3 se utilizó como control positivo para la expresión basal de HLA clase I y HLA-DR.

GRAFICAS Y TABLAS

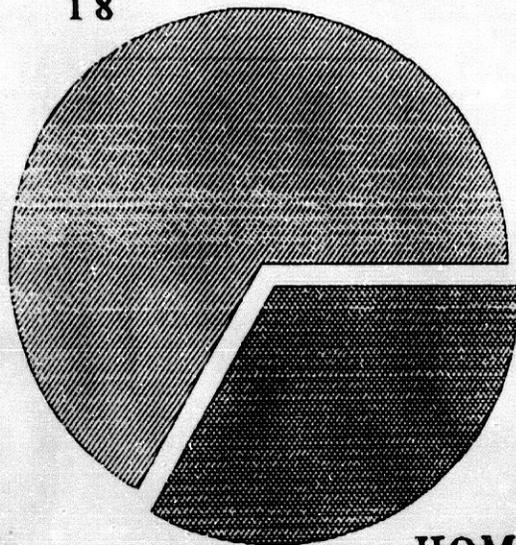
Anexo 1: DESCRIPCION DE LA MUESTRA.

MELANOMAS M. PRIMITIVOS

SEXO

Fig. 1

MUJERES 66.7%
18

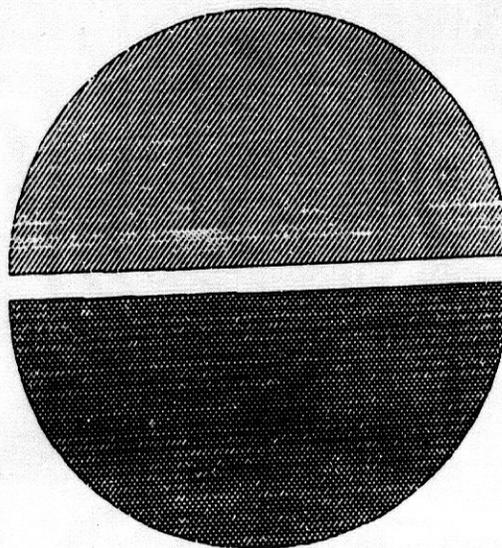


HOMBRES 33.3%
9

EDAD: Min.25/Max.72

Fig. 2

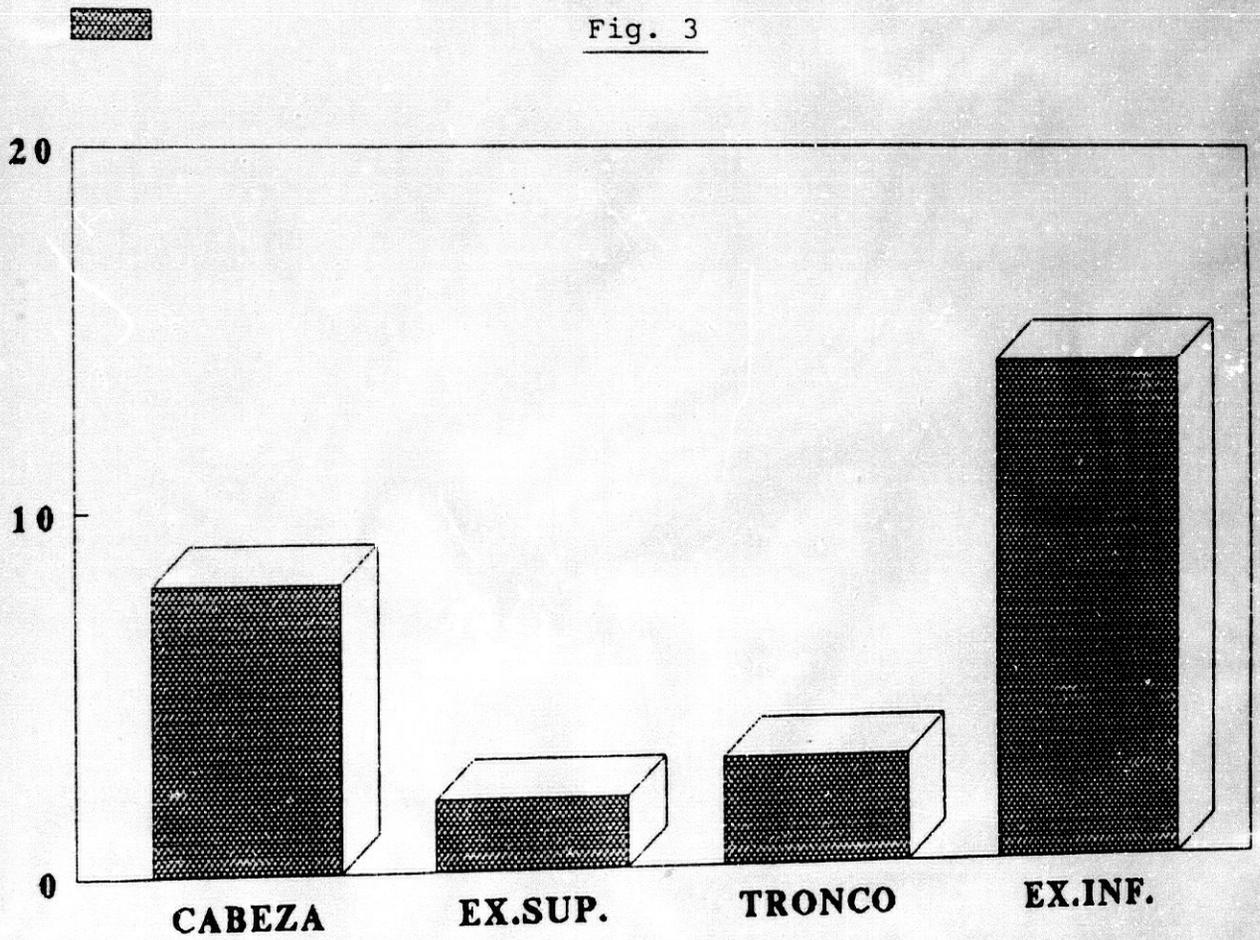
MUJERES 49.9%
50.6



HOMBRES 50.1%
50.7

MELANOMA M. PRIMITIVO LOCALIZACION

Fig. 3



MELANOMA M. PRIMITIVO FORMAS ANATOMOCLINICAS

Fig. 4

L.M.M. 22.2%

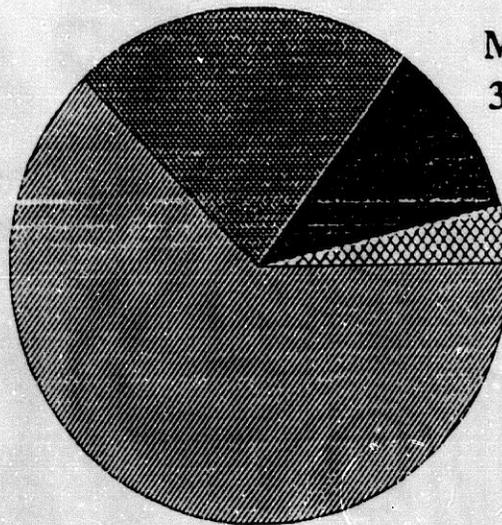
6

M.N. 11.1%

3

ACRAL 3.7%

1



S.S.M. 63.0%

17

PIGMENTACION

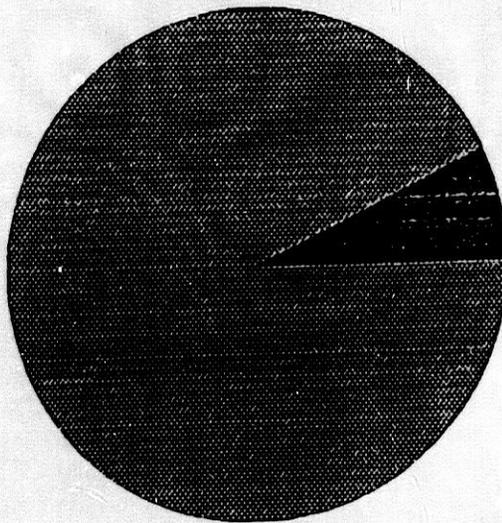
Fig. 5

SI 92.6%

25

NO 7.4%

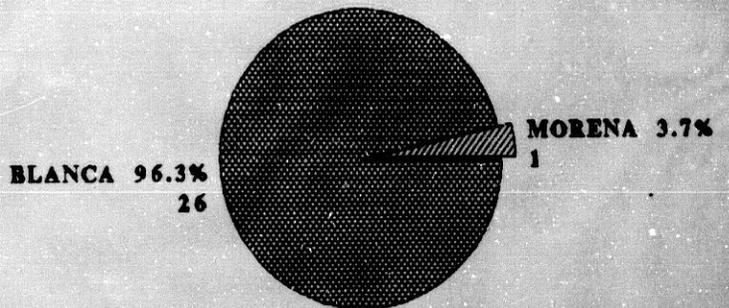
2



CARACTERES FENOTIPICOS

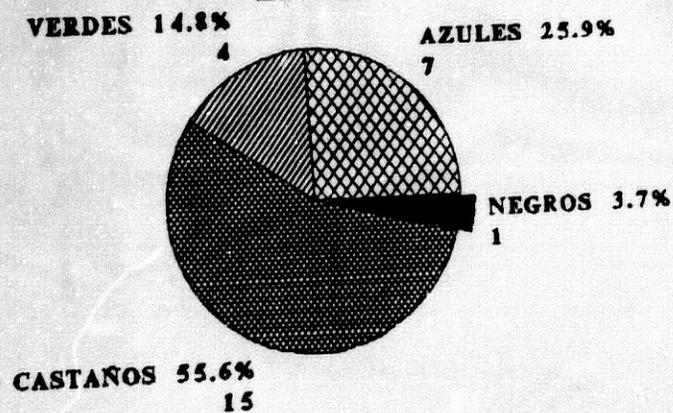
**MELANOMAS M. PRIMITIVOS
COLOR DE LA PIEL**

Fig. 6



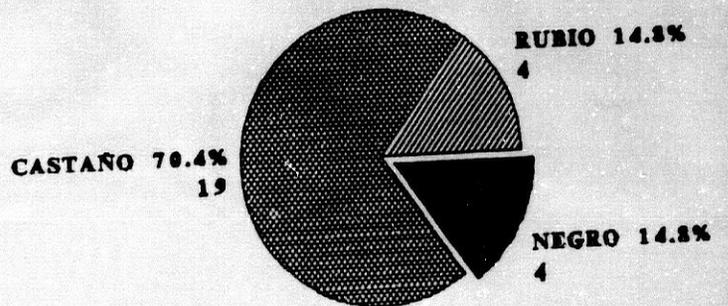
**MELANOMA M. PRIMITIVO
COLOR DE LOS OJOS**

Fig. 7



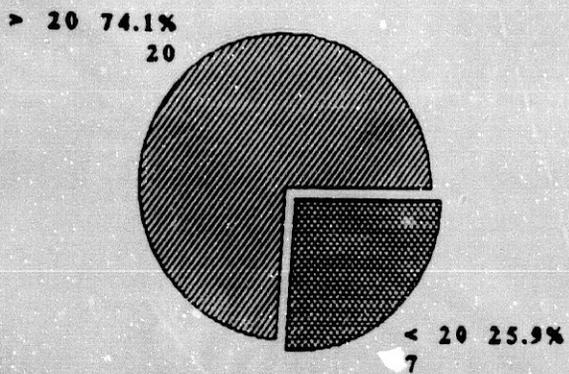
**MELANOMA M. PRIMITIVO
COLOR DEL PELO**

Fig. 8



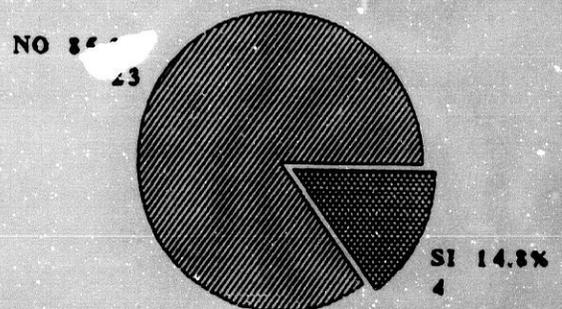
**MELANOMAS M. PRIMITIVOS
NUMERO DE NEVUS**

Fig. 9



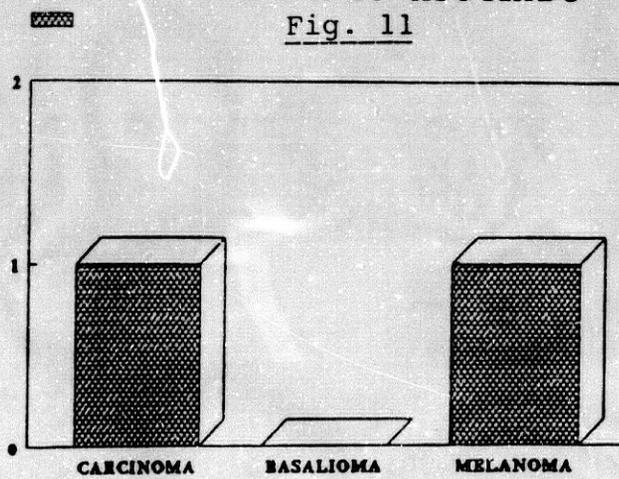
**MELANOMA M. PRIMITIVO
PRECANCER ASOCIADO**

Fig. 10



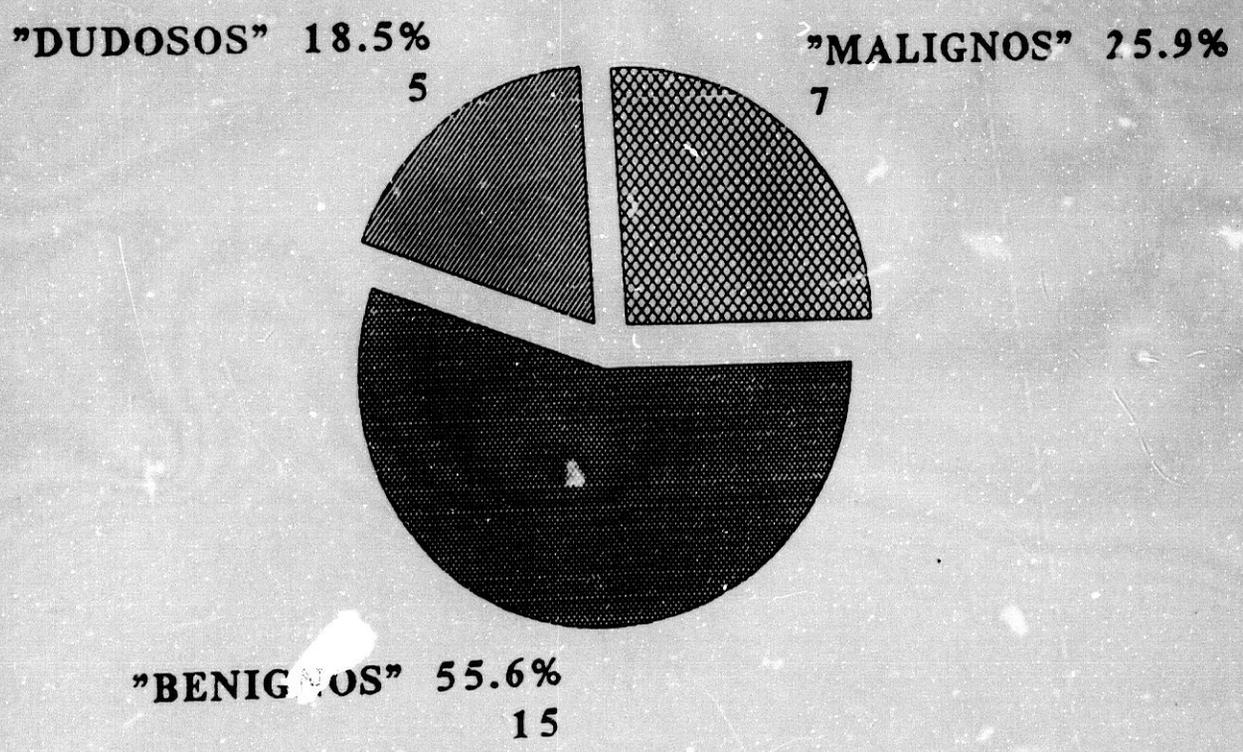
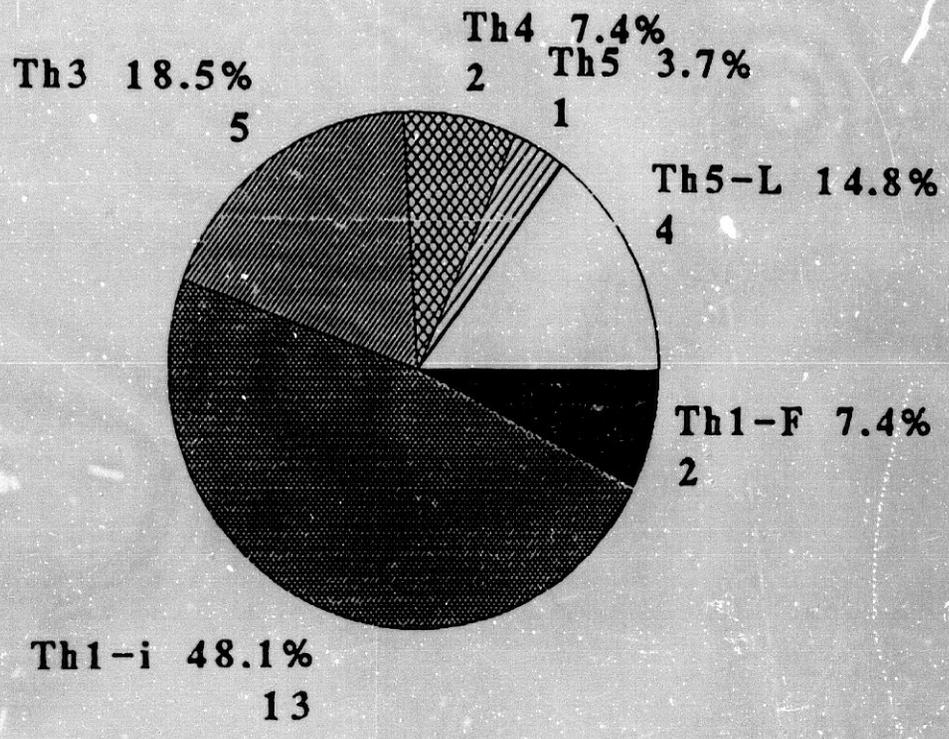
**MELANOMA M. PRIMITIVO
CANCER CUTANEO ASOCIADO**

Fig. 11



MELANOMA M. PRIMITIVO TERMOGRAFIA

Fig. 12



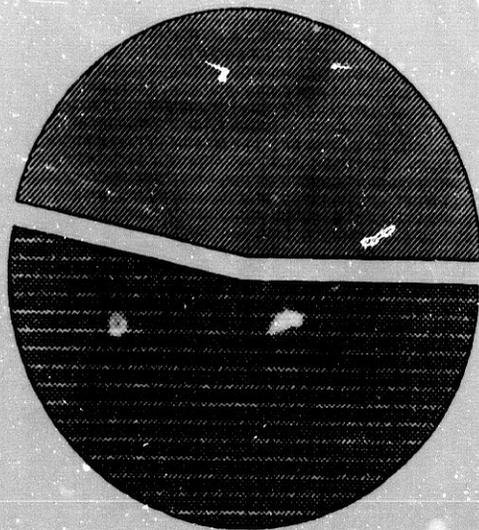
MELANOMAS M. METASTASICOS

SEXO

Fig. 13

MUJERES 46.9%

15

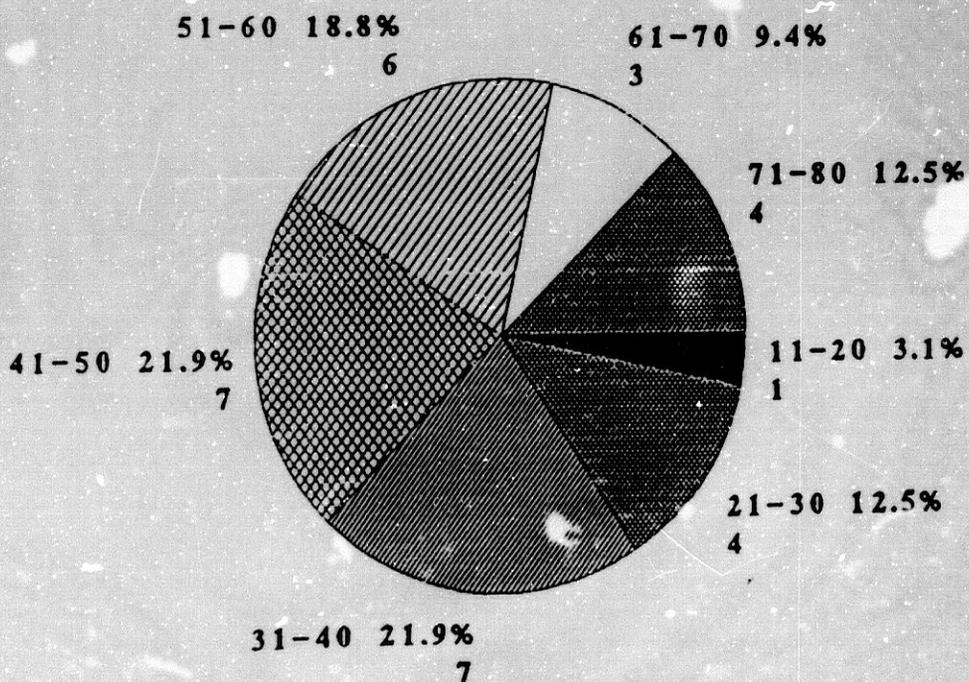


VARONES 53.1%

17

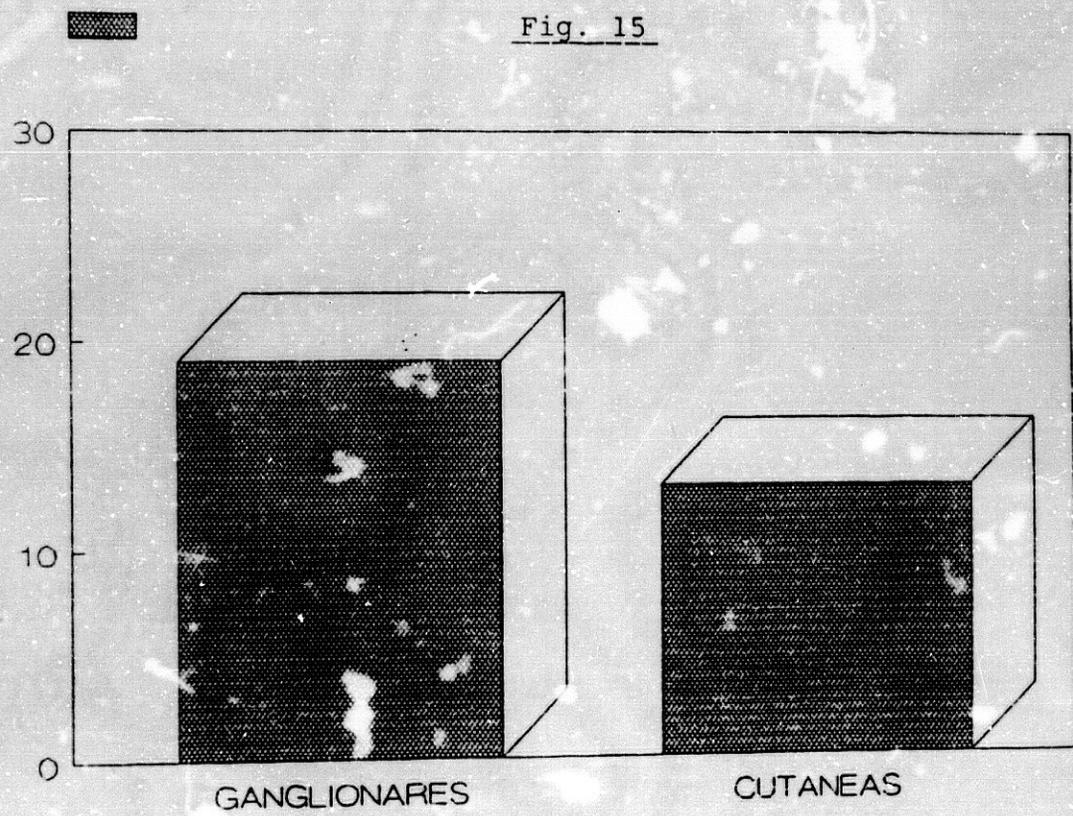
EDAD

Fig. 14



MELANOMAS M. METASTASICOS LOCALIZACION

Fig. 15

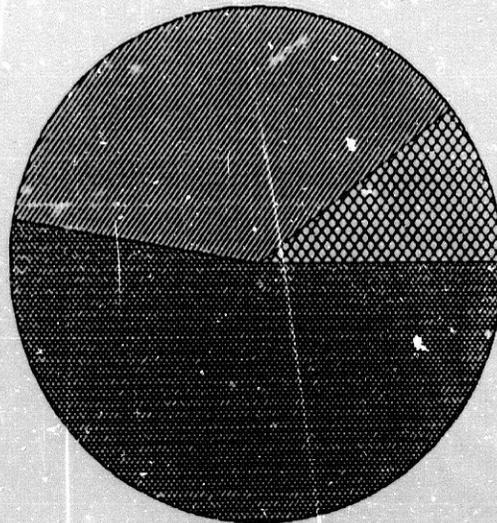


MELANOMAS M. METASTASICOS METASTASIS GANGLIONARES

Fig. 16

AXILARES 36.8%

7



CERVICAL 10.5%

2

INGUINALES 52.6%

10

METASTASIS CUTANÉAS

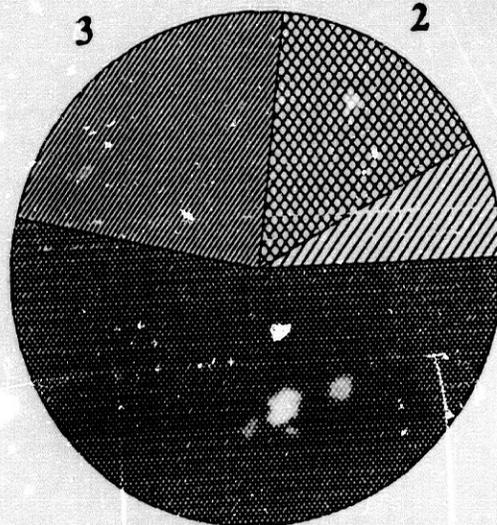
Fig. 17

TRONCO 23.1%

3

EX.INF. 15.4%

2



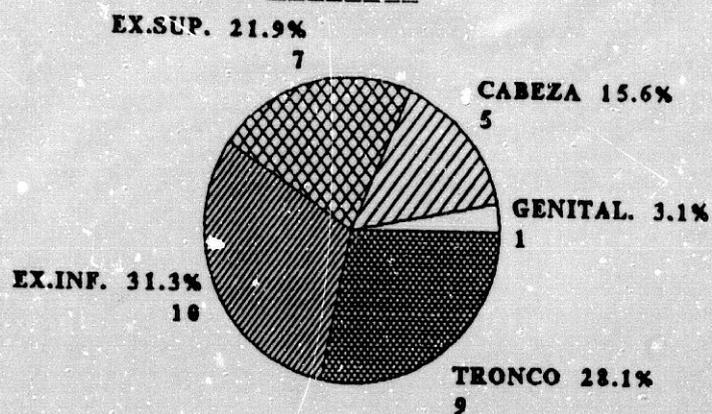
GENITAL. 7.7%

1

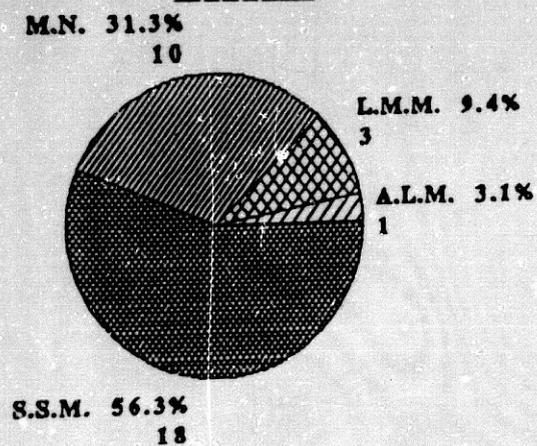
CABEZA 53.8%

7

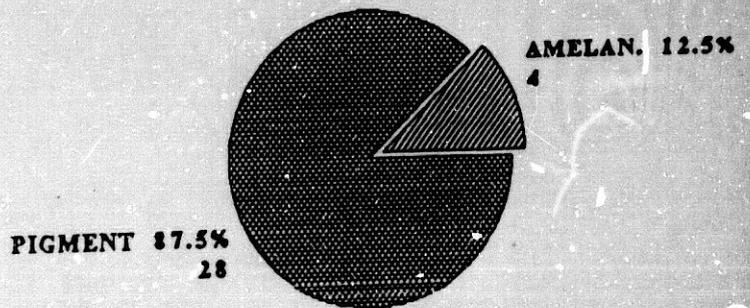
MELANOMAS M. METASTASICOS
LOCALIZACION DEL PRIMARIO
Fig. 18



MELANOMAS M. METASTASICOS
FORMA CLINICA DEL PRIMARIO
Fig. 19

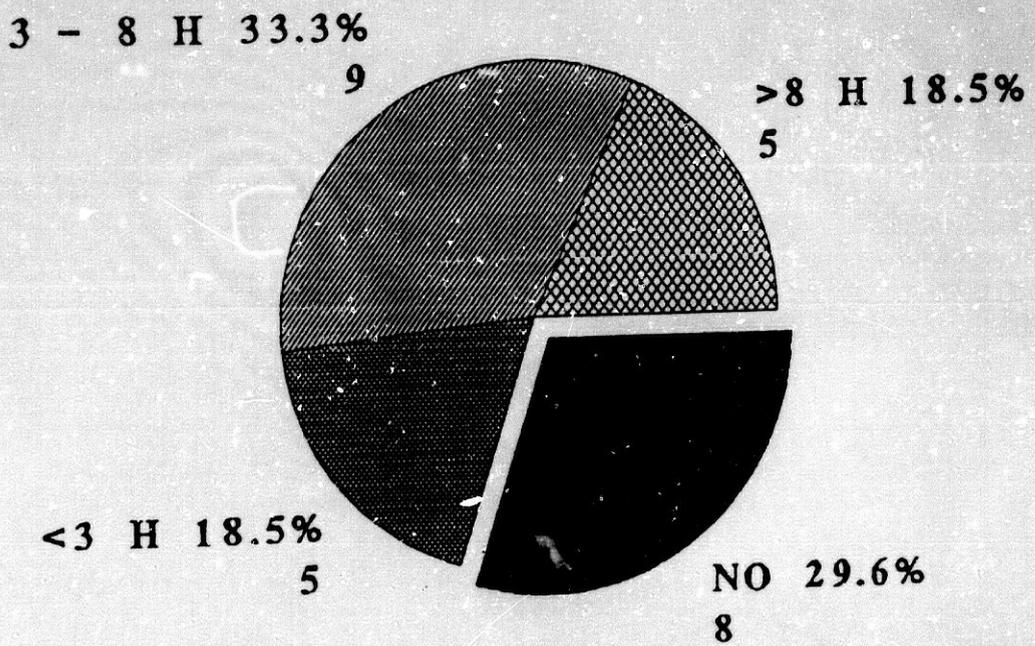
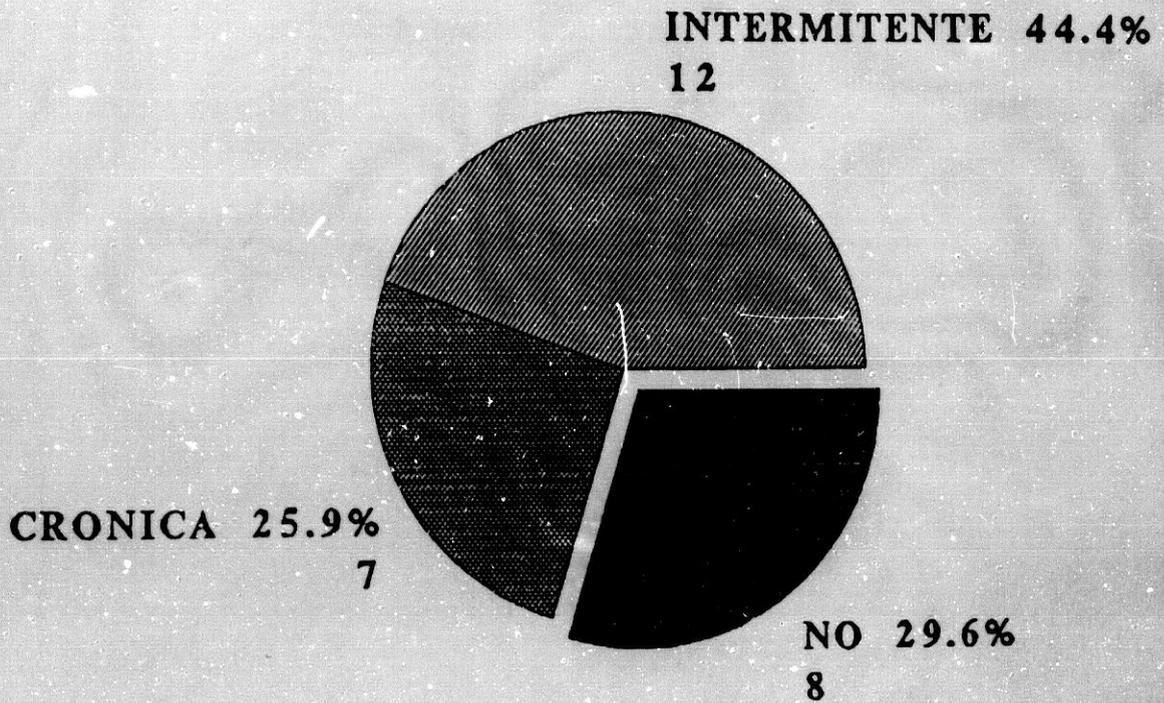


MELANOMAS M. METASTASICOS
PIGMENTACION DEL PRIMARIO
Fig. 20



MELANOMA M. PRIMITIVO EXPOSICION SOLAR

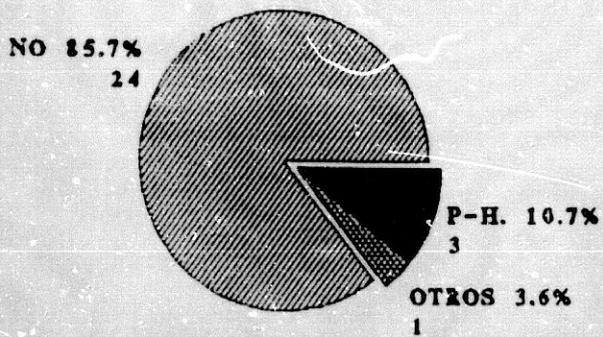
Fig. 21



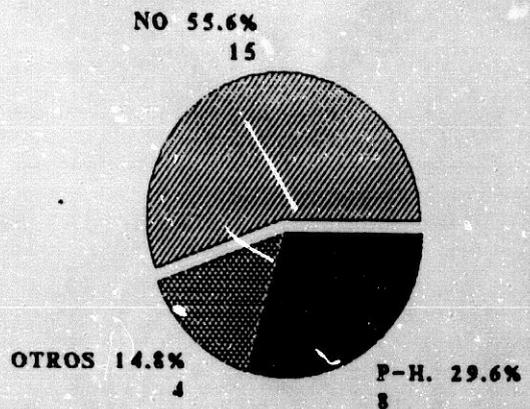
MELANOMAS M. PRIMITIVOS

Fig. 22

ANTECEDENTES FAMILIARES -DIABETES-



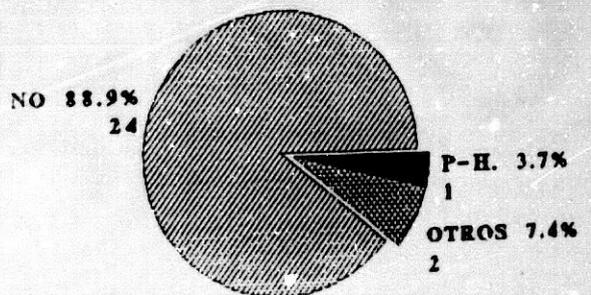
ANTECEDENTES FAMILIARES CANCER VISCERAL



ANTECEDENTES FAMILIARES CANCER CUTANEO.N.M.



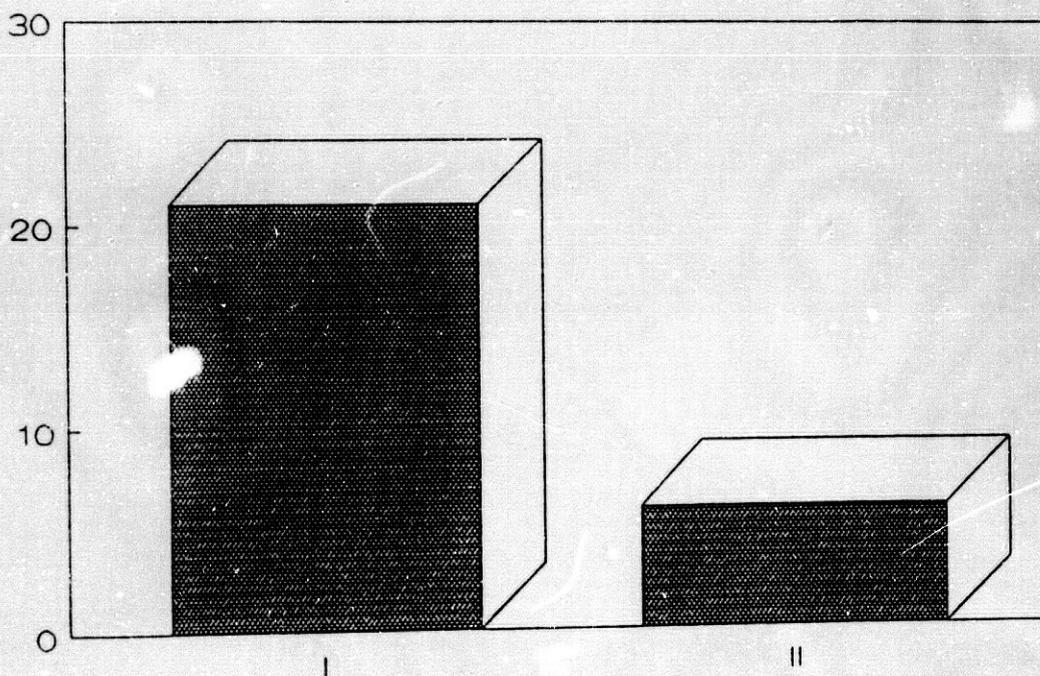
ANTECEDENTES FAMILIARES MELANOMA



MELANOMAS M. PRIMITIVOS ESTADIO EVOLUTIVO

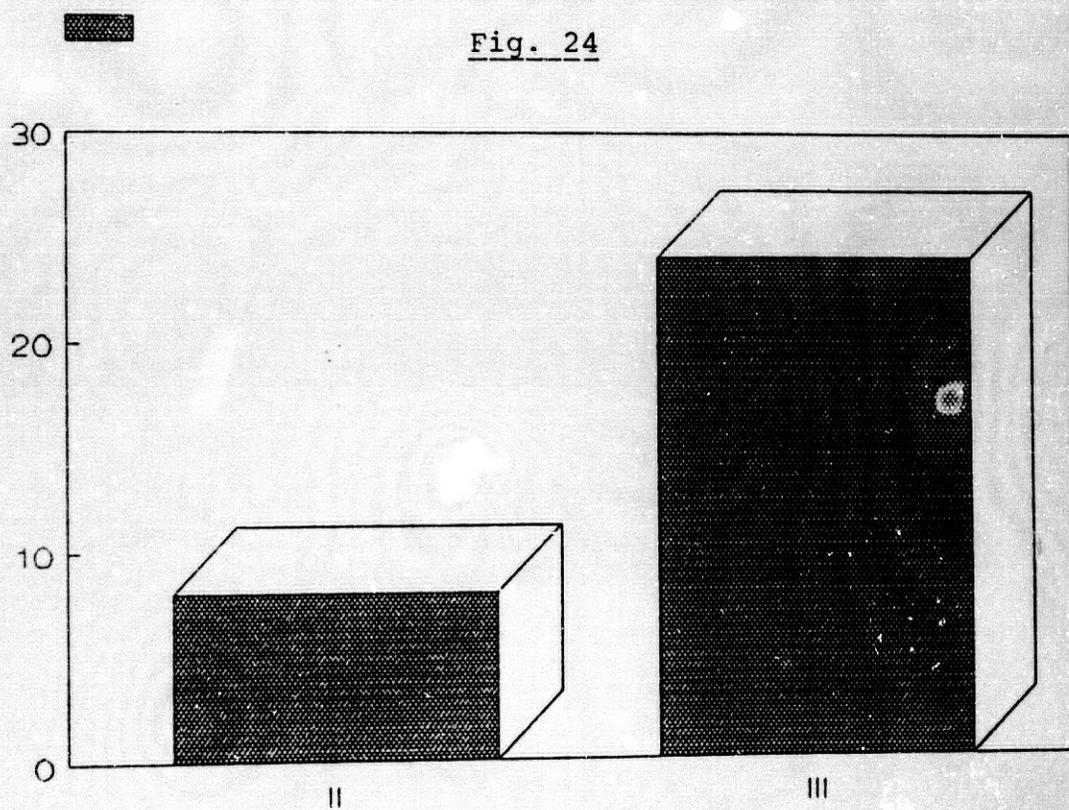


Fig. 23



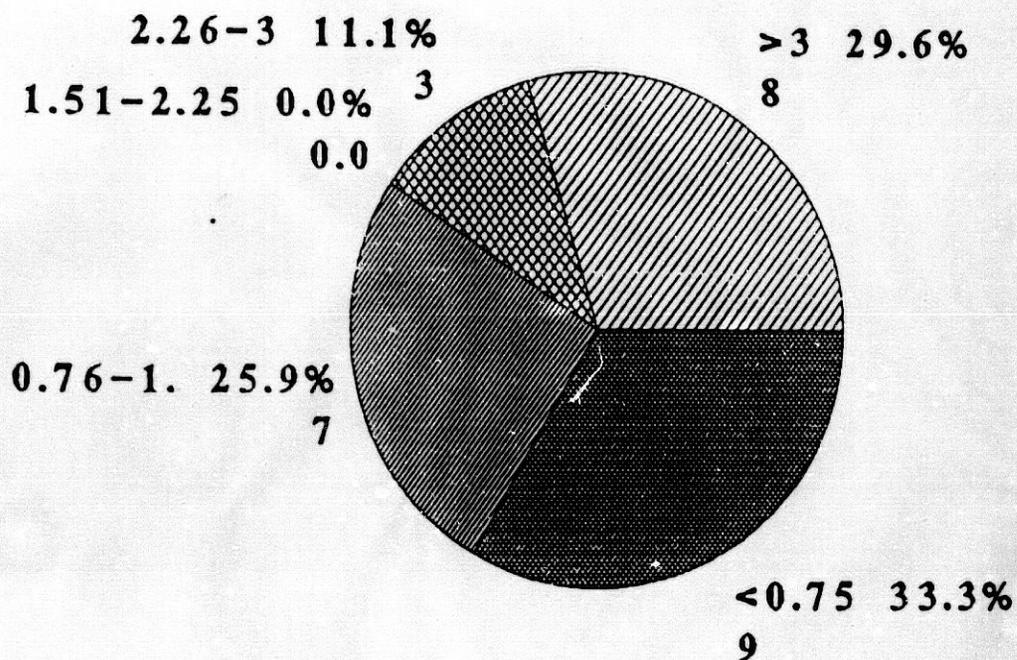
MELANOMAS M. METASTASICOS ESTADIO DEL PRIMARIO

Fig. 24



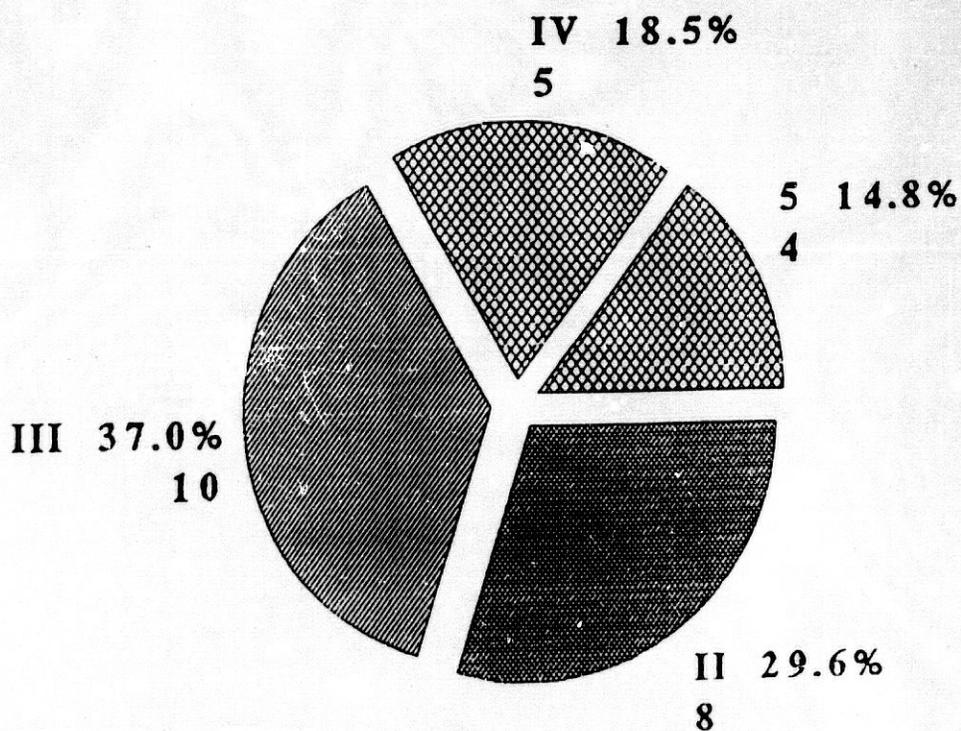
MELANOMA M. PRIMITIVO ESPESOR DE BRESLOW

Fig. 25



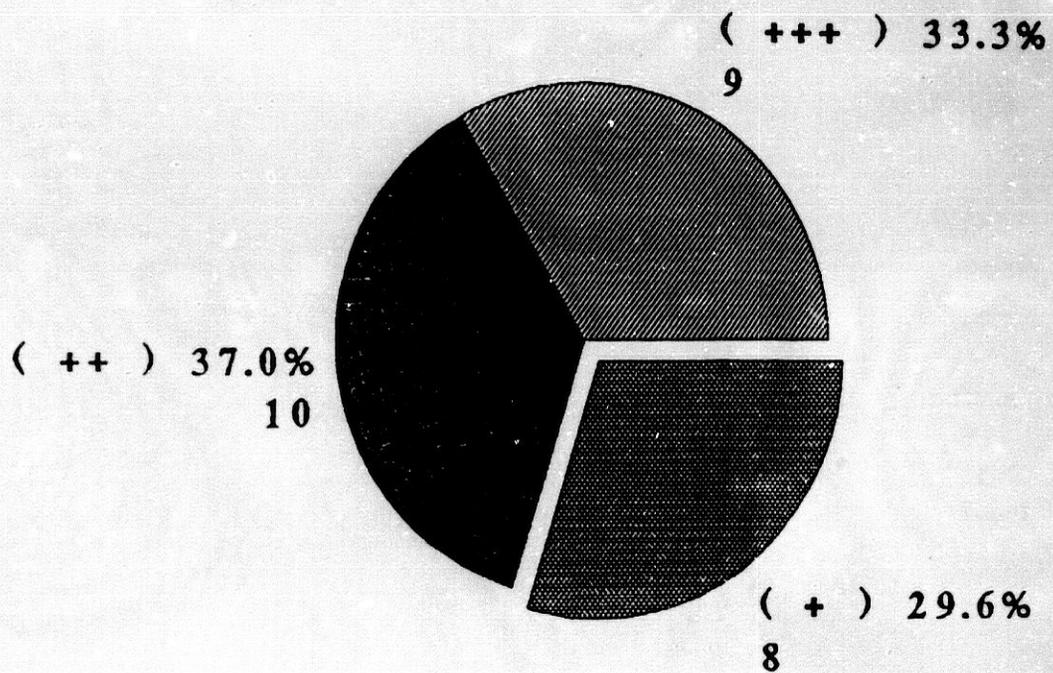
NIVEL DE CLARK

Fig. 26



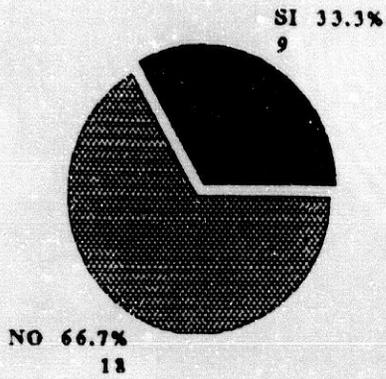
MELANOMA M. PRIMITIVO INFILTRADO

Fig. 27



**MELANOMA M. PRIMITIVO
ULCERACION**

Fig. 28



**MELANOMA M. PRIMITIVO
CITOLOGIA**

Fig. 29

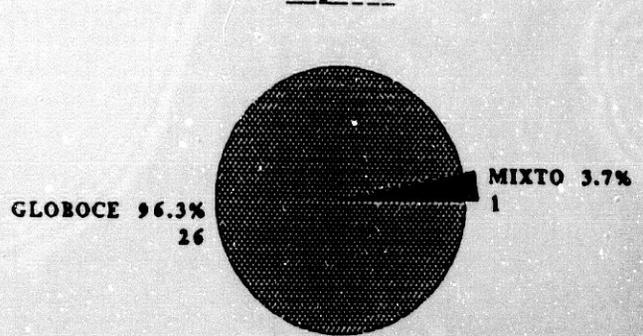


Fig. 30

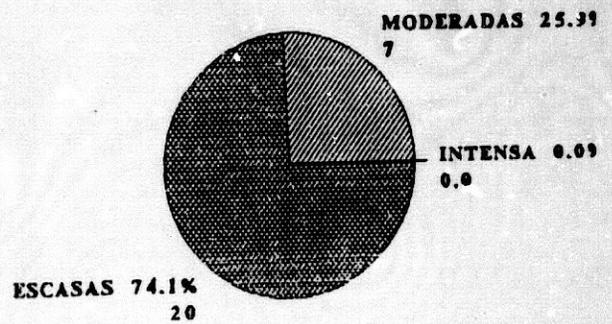
MITOSIS

ESCASAS: < 1 X CAMPO / 20 CAMPOS

MODERADAS: 1 - 4 X CAMPO / 20 CAMP.

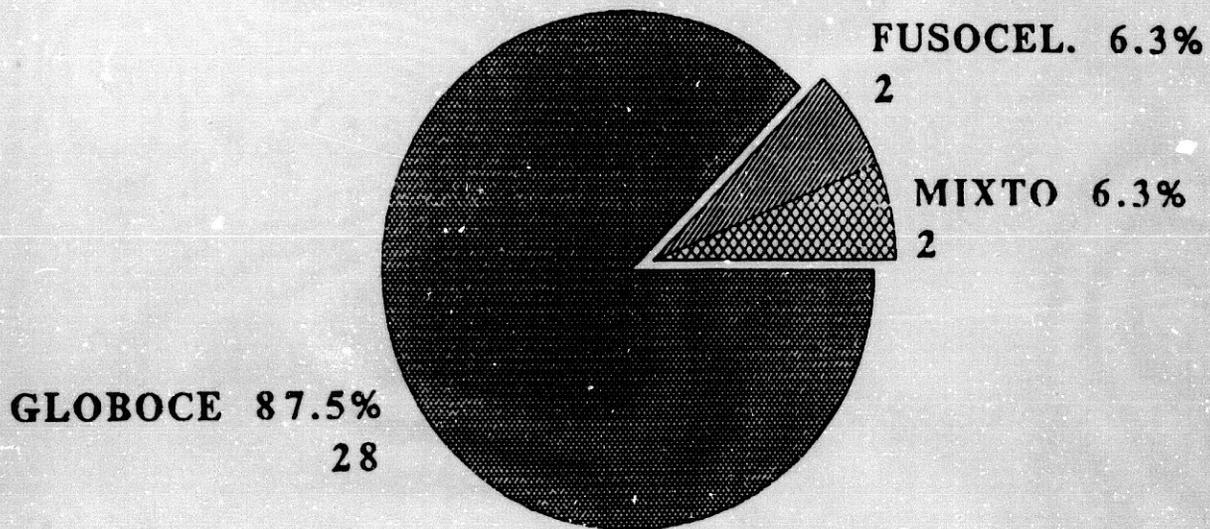
INTENSAS : > 5 X CAMPO / 20 CAMPOS.

**MELANOMA M. PRIMITIVO
MITOSIS**



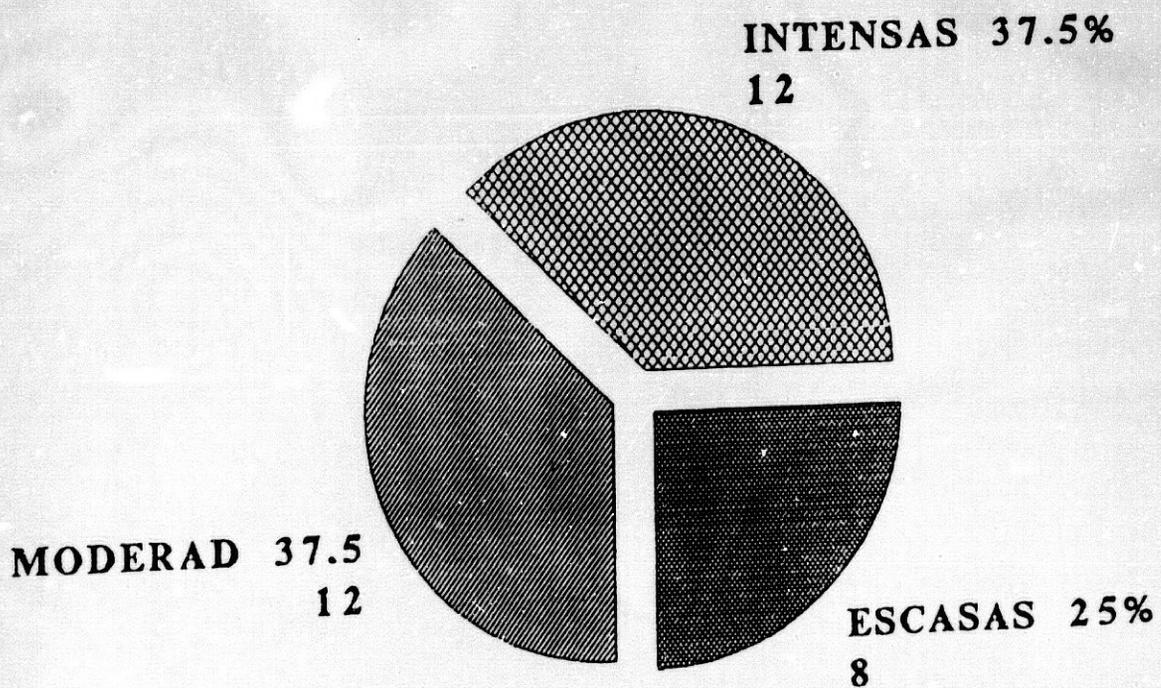
MELANOMAS M. METASTASICOS
CITOLOGIA DE LA METASTASIS

Fig. 31



MITOSIS

Fig. 32

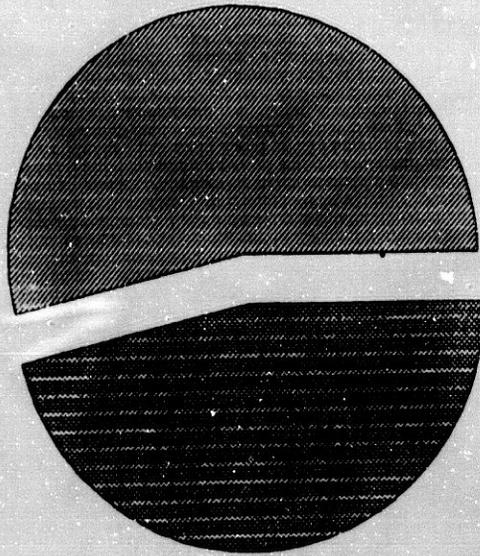


MELANOMAS M. METASTASICOS ESPESOR DEL PRIMARIO

Fig. 33

> 3 mm 53.8%

14



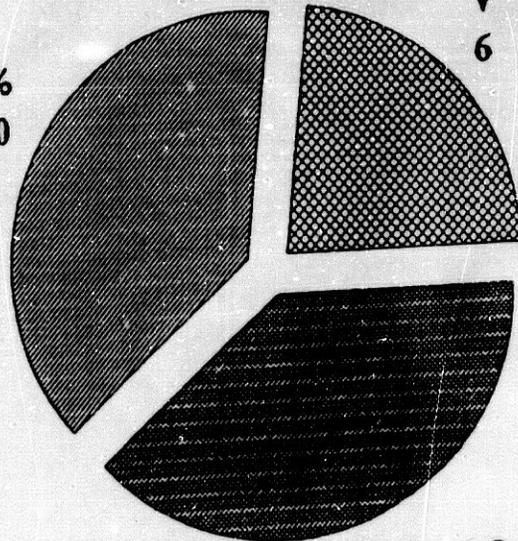
< 3 mm 46.2%

12

NIVEL DE CLARK DEL PRIMARIO

Fig. 34

IV 38.5%
10



V 23.1%

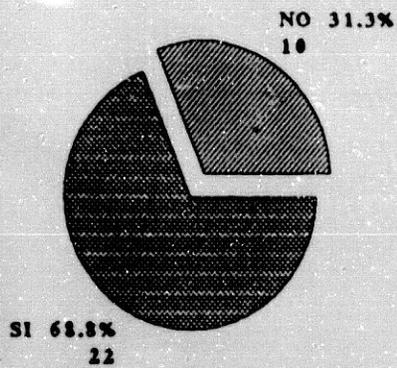
6

III 38.5%

10

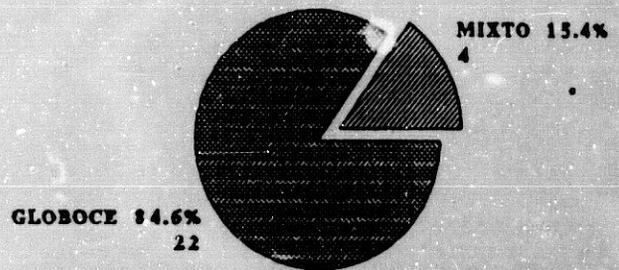
**MELANOMAS M. METASTASICOS
ULCERACION EN EL PRIMARIO**

Fig. 35



**MELANOMAS M. METASTASICOS
CITOLOGIA DEL PRIMARIO**

Fig. 36



**MELANOMAS M. METASTASICOS
MITOSIS EN EL PRIMARIO**

Fig. 37

MITOSIS

ESCASAS: < 1 X CAMPO / 20 CAMPOS
 MODERADAS: 1 - 4 X CAMPO / 20 CAMP.
 INTENSAS : > 5 X CAMPO / 20 CAMPOS.

