



Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Área de Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía
Facultad de Medicina
Universidad de Córdoba

**Regulación de la lisis de células de melanoma
mediante coestimuladores y receptores
inhibidores de la citotoxicidad**

**Trabajo presentado por Javier García Casado para optar al grado de Doctor por
la Universidad de Córdoba**

En Córdoba a 29 de noviembre de 2002

Fdo. Javier García Casado



D. JOSÉ PEÑA MARTÍNEZ, CATEDRÁTICO DE INMUNOLOGÍA Y JEFE DE SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFIA DE CÓRDOBA

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “**Regulación mediante coestimuladores e inhibidores de la lisis de células de melanoma**”, ha sido realizada bajo mi dirección por D. Javier García Casado y que reúne a mi juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Y para que conste, expido el siguiente certificado.

En Córdoba a 29 de Noviembre de 2002

Fdo. Prof. Dr. José Peña Martínez



Dña. RAQUEL TARAZONA LAFARGA, PROFESORA TITULAR DE INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **“Regulación mediante coestimuladores e inhibidores de la lisis de células de melanoma”**, ha sido realizada bajo mi dirección por D. Javier García Casado y que reúne a mi juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Y para que conste, expido el siguiente certificado.

En Córdoba a 29 de Noviembre de 2002

Fdo. Prof. Dr. Raquel Tarazona Lafarga

Agradecimientos

Una frase que siempre me ha gustado es aquella que dice “de bien nacidos es ser agradecidos”, por esa razón, no quiero olvidarme de nadie en unos agradecimientos que van dedicados a toda esa gente que quiero.

Empiezo por agradecer a Raquel y a D. José la confianza que un día depositaron en mí para la elaboración de este trabajo, espero no haberlos defraudado en este tiempo y decirles que agradezco sus enseñanzas para crecer como científico y como persona.

Agradezco especialmente a todo los enfermos la amabilidad y disposición que mostraron al donar su sangre para este trabajo.

A todos los becarios de inmunología os quiero decir que esta tesis nunca habría sido posible sin vuestra ayuda, esta tesis es de todos y por eso mismo aquí están vuestros nombres y mi agradecimiento a M^a Dolores (la alegría), a Pilar (la firmeza), a Teresa (el encanto del caribe), a Chelo (la serenidad), a Gema (la dulzura), a M^a José (el tesón), a Azahara (el corazón), a Chema (el humor), a Almudena (la constancia), a Agustín (la paciencia), a Miriam (la forzza) y a Tina (the smile).

A Esther quiero decirle que me alegro de haber trabajado “codo con codo” junto a ella, le agradezco que siempre me regalara sus canciones, sus sonrisas y su apoyo cuando más falta me hacían, ¡gracias por ser más que una amiga!.

Y de Olguita, qué puedo decir, cuando empecé este trabajo ella fue quien me enseñó el ficoleo, el microscopio, la citometría de flujo... ahora me enseña cosas como la constancia, la generosidad, la firmeza, la tenacidad, la paciencia,... además es mi compañera, mi confidente y mi amiga, ¿qué más puedo decir de ella?.

Por supuesto no me voy a olvidar de las técnicas Pilar, Mercedes, Ana, M^a José, Magdalena porque ellas son el corazón del laboratorio, sin embargo, un agradecimiento especial se lo quiero dedicar a “mis chicas favoritas”, a Pilar Aguilar por ser encantadora, a M^a José Prados porque supo hacerme reír, y a Cruz por su contagiosa alegría.

A Rafa Pérez, Manolo Santamaría y a Rafa Solana les agradezco sus sabios consejos para guiarme por los caminos de la ciencia.

A los residentes Sara, Carmen, María y Caballos les agradezco su ayuda desinteresada, y a Rafa González y a Corona Alonso que no me despidieran antes de tiempo.

Del hospital me queda agradecer a Marisa lo bien que se portó siempre conmigo, y a Juan, Maricarmen y al resto de personal su amabilidad y su simpatía cuando hubo que sacar sangre. Por otro lado agradezco a las limpiadoras su sacrificado trabajo y su compañía por las tardes.

A mis amigos Adolfo, Juan, Caba, Cacho, Guti, Alvaro, Pipe, Dani, David, Vicente, Pepe Vera, Manolo, Pepe, Rafa, Rambo, María, Maribel, Neni, Rocío, Mercedes, Maricruz, Isa, Inma, Carmen, Melania, Mónica, Lioba, Elvira, Raquel, Teresa, sólo les digo que mi gran suerte en esta vida es tener a los mejores amigos del mundo.

A mis tíos, mis primos y sobre todo a mis abuelas les agradezco todo el cariño que siempre recibo de ellos.

A Elena le doy las gracias porque me ha soportado durante toda esta tesis, gracias también por hacerme feliz y muchas gracias por quererme, ojalá nada nos separe...

A mis hermanos de nuevo les digo que soy afortunado de haber crecido junto a dos grandes personas.

A mis padres les agradezco la educación que me han dado, su confianza en mí, su cariño, su apoyo en todo momento y que me hayan regalado mi vida y sus vidas.

A la memoria de mi abuelo

*"Una de las principales
enfermedades del hombre es
su inquieta curiosidad por
conocer lo que no puede
llegar a saber"*
Pascal Blaise

*"En el pensamiento
científico siempre están
presentes elementos de
poesía"*
Albert Einstein

INDICE

ABREVIATURAS	14
INTRODUCCION	16
1. EPIDEMIOLOGÍA	17
1.1. Factores de riesgo individuales	18
1.1.1. Predisposición genética	18
1.1.2. Lesiones pigmentadas	18
1.1.3. Estado de inmunosupresión	19
1.2. Factores ambientales	19
2. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL MELANOMA	19
2. 1. Mecanismos efectores antitumorales	19
2.1.1. Mecanismos efectores celulares	19
2.1.1.1 Linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs)	20
2.1.1.2. Linfocitos T helper CD4+	21
2.1.1.3. Células NK	21
2.1.1.4. NKT	22
2.1.1.5. Macrófagos	22
2.1.2. Mecanismos efectores solubles	22
2.1.2.1. IL-2	22
2.1.2.2. Interferón- α	23
2.2. Antígenos tumorales asociados a células de melanoma	23
2.2.1. Antígenos asociados a diferentes tumores	24
2.2.2. Antígenos de diferenciación	24
2.2.3. Antígenos específicos de tumor	24
2.3. Coestimulación del linfocito T	25
2.3.1. Expresión de CD28 y CTLA-4 en linfocitos T	25
2.3.2. Expresión de CD80 y CD86	26
2.3.3. Coestimulación en la respuesta inmune antitumoral	27
2.3.3.1. Expresión de ligandos de moléculas coestimuladoras en células de melanoma	27

2.3.3.2. Coestimulación del linfocito T en el reconocimiento de células de melanoma	28
2.4. Receptores inhibidores de la citotoxicidad	29
2.4.1. Clasificación de los receptores NK específicos para MHC	29
2.4.1.1. Superfamilia de las inmunoglobulinas	29
2.4.1.1.1. Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs)	29
2.4.1.1.2. Immunoglobulin like transcripts	30
2.4.1.2. Superfamilia lectinas tipo C	31
2.4.2. Expresión de receptores reguladores de la citotoxicidad en células T	32
2.4.2.1. Fenotipo de células T que expresan receptores reguladores de la citotoxicidad	32
2.4.2.2. Balance de receptores inhibidores/activadores en células T	32
2.4.2.3. Expresión de receptores inhibidores en la respuesta antitumoral	33
2.4.3. Otros receptores asociados a células NK	34
2.4.3.1. CD56	34
2.4.3.2. CD57	35
2.4.3.3. CD16	35
2.4.3.4. CD244	36
2.5. Estrategias de evasión al sistema inmunitario	36
2.5.1. Autotolerancia a antígenos de melanoma	36
2.5.2. Modificación del MHC	37
2.5.3. Producción de citoquinas	37
2.5.4. Expresión de HLA-G en células de melanoma	37
2.5.5. Defectos en la regulación de la apoptosis	38
2.5.6. Defecto en la síntesis de óxido nítrico	38
2.5.7. Defectos en la coestimulación de los linfocitos T	38
2.5.8. Expresión de receptores inhibidores	38
3. INMUNOTERAPIA: VACUNAS E INMUNOMODULADORES	38
3.1. Vacunas derivadas de cultivo de células multivalentes	39
3.2. Vacunas de células autólogas	39

3.3. Vacunas con células irradiadas	39
3.4. Vacunas de células con ADN recombinante	40
3.5. Vacunas con péptidos	40
3.6. Vacunas de ADN "desnudo"	40
3.7. Vacunas de células dendríticas	41
3.8. Inmunomoduladores	41
3.8.1. GM-CSF	41
3.8.2. IL- 2	41
3.8.3. IL-12	42
3.8.4. IFN- γ	42
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Líneas celulares	46
1.1. Mantenimiento líneas celulares de melanoma	46
1.2. Líneas celulares YT-Indy e YT-Indy-cl43	46
1.3. Líneas celulares 721.221 y 721.221-Cw3	46
2. Ensayos de citotoxicidad	46
3. Anticuerpos	47
3.1 Anticuerpos para fluorescencia directa	48
3.2. Anticuerpos para fluorescencia indirecta	48
3.3. Anticuerpos secundarios para fluorescencia indirecta	48
3.4. Controles de fluorescencia	48
3.5. Anticuerpos para la separación inmunomagnética	48
4. Sujetos de estudio	48
5. Aislamiento de linfocitos	49
5.1. Aislamiento de la fracción CD8+	49
6. Estudios de inmunofluorescencia	50
6.1. Fluorescencia directa	50
6.2. Fluorescencia indirecta	51

6.3. Fluorescencia de moléculas intracelulares	51
6.4. Fluorescencia de tetrámeros	51
6.5. Determinación de moléculas de superficie en líneas de melanoma	52
6.6. Adquisición de células	52
7. Cultivo de PBLs con Interferón alfa2b	52
8. Tipaje HLA clase I de la población en estudio	53
9. Síntesis de péptidos	53
10. Expansión de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	53
11. Determinación de la producción de IFN- γ mediante ELISPOT	54
12. Determinación de la producción de IFN- γ en ensayos de lisis (CITOSPOT)	55
13. Análisis estadístico	55
14. Reactivos	55
RESULTADOS	57
1. Diseño de un modelo “ <i>in vitro</i> ” para el estudio de la lisis en células de melanoma CD80+	58
2. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos T CD8+ de sangre periférica de enfermos de melanoma	61
3. Expresión de CD28 en linfocitos T CD8+ de sangre periférica cultivados con Interferón alfa2b	63
4. Expresión de receptores asociados a células NK en linfocitos T CD8+ de enfermos de melanoma	64
5. Expresión de receptores asociados a células NK en las subpoblaciones CD8bright CD28+ y CD28- de enfermos de melanoma	67
6. Expresión de receptores asociados a células NK en las subpoblaciones CD8bright CD56+ y CD56- de enfermos de melanoma	69
7. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright de enfermos de melanoma	71
8. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD28+ y CD28- de enfermos de melanoma	72
9. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD56+ y CD56- de enfermos de melanoma	73
10. Expresión de moléculas efectoras en células CD8bright de enfermos de melanoma	75

11. Expresión de moléculas efectoras en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de enfermos de melanoma	76
12. Expansión de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	78
13. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	78
14. Expresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	79
15. Expresión de receptores asociados a células NK en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	81
16. Expresión de marcadores de diferenciación en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	81
17. Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos	82
18. Producción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos expandidos <i>in vitro</i>	83
19. Ensayos de lisis mediados por linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos expandidos <i>in vitro</i>	84
20. Ensayos de CITOSPOT frente a la línea de melanoma M6/B7 con linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos expandidos <i>in vitro</i>	85
DISCUSIÓN	87
La lisis de células de melanoma mediada por CD28 es inhibida por el receptor KIR2DL2	88
Caracterización fenotípica de linfocitos T CD8 en sangre periférica de enfermos de melanoma	89
Caracterización fenotípica y funcional de linfocitos T específicos de antígenos de melanoma	98
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	106
PUBLICACIONES	120

INTRODUCCIÓN

El incremento en la incidencia del melanoma maligno en los últimos años y su estrecha relación con los factores individuales y ambientales, así como la importancia de un diagnóstico precoz, son datos que justifican la enorme trascendencia de este tumor. Su desarrollo en una localización, en general, accesible a la exploración y la facilidad de diagnóstico ha contribuido a que cada vez se traten más melanomas en fases iniciales, cuando la mayor parte son curables. Sin embargo, cuando la enfermedad se disemina, la mayoría de los pacientes fallecen en un plazo corto de tiempo. Por todo ello, las medidas de prevención primarias y secundarias son muy importantes para reducir estas cifras tan negativas. Al mismo tiempo, un mejor conocimiento inmunológico de esta neoplasia, junto al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, permitirán avanzar más rápido en el control del melanoma cutáneo.

El sistema inmune a través de la inmunidad celular juega un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células tumorales. La respuesta inmune celular requiere un reconocimiento específico del tumor seguido de una fase de diferenciación y activación que finaliza con la inducción de la lisis del tumor. Por esta razón el estudio de marcadores de diferenciación y activación de los linfocitos T CD8 de enfermos de melanoma así como el análisis fenotípico y funcional de moléculas coestimuladoras y receptores reguladores de la citotoxicidad en estas células nos permitirá un mejor conocimiento de la respuesta inmune antitumoral.

1. EPIDEMIOLOGÍA

El melanoma maligno es una neoplasia originada en los melanocitos. La mayoría de estos tumores se desarrollan en la piel, principalmente a nivel epidérmico y ocasionalmente en la dermis y en mucosas. El melanoma es el cáncer que más rápidamente ha aumentado su incidencia en la población blanca en estas últimas décadas, estimándose que se duplica en número de casos cada 10 ó 15 años. En España el número de casos se ha triplicado en los últimos veinte años hasta convertirse en el cáncer que más aumenta. En el área de Córdoba y Jaén un estudio del Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora del Hospital Universitario Reina Sofía indica que el número de casos en esta zona desde 1989 a 1998 se ha duplicado. Según el Doctor García Hortelano la incidencia en España es de 11 casos por 100.000 habitantes (García

et al. 2000). A diferencia de muchos cánceres cuya frecuencia disminuye en los grupos de edad avanzada, las tasas de incidencia de melanoma siguen aumentando con la edad, aunque este incremento es menor en las mujeres que en los varones. La posibilidad de padecer un melanoma depende de muchos factores que se pueden dividir en factores de riesgo individuales o endógenos y factores de riesgo ambientales o exógenos.

1.1. Factores de riesgo individuales

Entre los factores de riesgo individuales se consideran la predisposición genética, la presencia de lesiones pigmentadas y un estado de inmunosupresión como precursores de la enfermedad.

1.1.1. Predisposición genética:

No se conocen aún todos los genes relacionados con el desarrollo del melanoma aunque parece que existen al menos cuatro genes implicados en la aparición de melanomas familiares, de estos cuatro genes, sólo un gen supresor, el p16, aparece alterado constantemente en la mayoría de estudios, presentando mutaciones y deleciones tanto en melanomas esporádicos como familiares (Gibbs et al. 2002).

Además de la predisposición genética, se acepta la existencia de un fototipo cutáneo asociado a una mayor predisposición de padecer melanoma. La incidencia de melanoma guarda relación con los fototipos que presentan una piel muy sensible. Esta sensibilidad frente al sol se considera un factor relacionado con el riesgo de padecer melanoma.

1.1.2. Lesiones pigmentadas:

La presencia de lesiones pigmentadas ha sido relacionada con el desarrollo de melanomas. Entre estas lesiones destacan los nevus melanocíticos congénitos que son aquellos presentes en el momento del nacimiento o que aparecen en las primeras semanas de vida y que algunos autores los consideran como potenciales precursores de melanoma. Los nevus melanocíticos displásicos adquiridos son tumores adquiridos de aspecto atípico caracterizados por una displasia melanocítica intraepidérmica. La presencia de un elevado número de nevus melanocíticos adquiridos se considera factor de riesgo alto y pueden

representar el factor de riesgo más importante para desarrollar un melanoma (Burton et al. 1993).

1.1.3. Estado de inmunosupresión:

Se ha observado que existe un aumento de nevos melanocíticos en pacientes inmunodeprimidos (Grob et al. 1996). En este sentido, los pacientes VIH positivos e individuos transplantados renales presentan un aumento de la incidencia del melanoma (Grob et al., 1996) que está asociado al estado de inmunodepresión de estos pacientes. Por esta causa, se ha sugerido que un estado inmunológico adecuado puede prevenir el desarrollo de melanoma a partir de nevos (Ross, 1989).

1.2. Factores ambientales

Respecto a los factores ambientales, la luz ultravioleta (UV) es el factor más importante para el desarrollo del melanoma. (Runger et al. 1995). En la carcinogénesis cutánea por radiación UV se producen daños a tres niveles: en primer lugar el daño celular, en segundo lugar los fallos en la reparación del ADN y por último la depresión inmunológica que puede originar una pérdida de la inmunovigilancia (Yarosh and Kripke, 1996). También se ha observado que una exposición intermitente a la luz UV es más peligrosa puesto que se van acumulando daños en el DNA cuando los mecanismos de reparación no están activos aún (de Gruijl et al. 2001).

2. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL MELANOMA

2.1. MECANISMOS EFECTORES ANTITUMORALES

Los mecanismos de eliminación del tumor por parte del sistema inmune son numerosos, variables y complejos reflejando la diversidad antigénica que existe. Se pueden dividir los mecanismos efectores en celulares y solubles.

2.1.1. Mecanismos efectores celulares:

Existen dos claras evidencias de la importancia de la eliminación de células tumorales mediada por la inmunidad celular. Una de ellas es la alta incidencia de esta enfermedad en pacientes con la inmunidad celular deprimida (Grob et al., 1996), la otra es la presencia de linfocitos T específicos de tumores en sangre periférica (Gervois et al. 2000; Oelke et al. 2000) y en infiltrados de tumor (Ge and Bao, 1996; Hishii et al. 1997). En la inmunidad celular tumoral, las células NK pueden mediar una respuesta contra células de melanoma que no expresan el MHC y que no pueden ser reconocidas por los linfocitos T (Bakker et al. 1998; Nasca and Carbone, 1999; Ruiz-Cabello et al. 1991). Las células NK activadas pueden representar además la mayor fuente de interferón- γ incrementando el procesamiento y presentación de las moléculas MHC de clase I y II por células de melanoma (Takeda et al. 2001). A continuación se describen brevemente los diferentes tipos celulares que participan en la respuesta inmune antitumoral:

2.1.1.1 Linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs)

Debido a su capacidad citotóxica, poseen un efecto antitumoral mediante el reconocimiento y destrucción de células de melanoma. Estos linfocitos pueden ejercer funciones de vigilancia reconociendo y eliminando células potencialmente malignas que expresan péptidos derivados de proteínas celulares mutantes presentados por el MHC-I. Los linfocitos T citotóxicos específicos para tumores pueden encontrarse en sangre periférica o infiltrando tumores sólidos donde reciben el nombre de TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes).

Una vez reconocida la célula tumoral, en la cascada de eventos que conducen a la apoptosis de la célula diana están implicadas dos vías: una primera calcio-dependiente en la que los linfocitos citotóxicos secretan gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzimas, y una segunda vía calcio-independiente en la que los linfocitos activados inducen apoptosis tras la unión de sus moléculas de Fas-L con el antígeno de superficie perteneciente a la familia de receptores TNF/NGF denominado APO-1, Fas o CD95 expresado en las células diana. Por tanto, la lisis mediada por linfocitos T CD8+ se produce fundamentalmente por estas tres causas:

- Por la liberación de la proteína perforina: esta proteína está presente en los gránulos citoplasmáticos de las células citotóxicas.

Produce poros a través de los cuales penetran otras proteínas como la granzima que causan la muerte, por lisis o necrosis, de la célula tumoral.

- Por efecto del factor de necrosis tumoral β (TNF- β): el TNF- β tiene la capacidad de matar células por inducción de apoptosis.

-Por la interacción Fas – Fas-L: Fas-L es una glicoproteína de membrana expresada fundamentalmente en la superficie de los linfocitos T citotóxicos activados. La molécula Fas-L del linfocito T citotóxico se une a las células que expresan el receptor Fas activándose la cascada de caspasas que culminan con la apoptosis de la célula diana. La proteína Fas-L también se encuentra en células de melanoma induciendo la lisis de los propios linfocitos T citotóxicos siendo éste uno de los mecanismos de escape tumoral (Greil et al. 1998; Hersey and Zhang, 2001).

2.1.1.2. Linfocitos T helper CD4+

El papel de estas células en la respuesta antitumoral es el de suministrar citoquinas para el desarrollo de linfocitos T citotóxicos eficaces. Secretan citoquinas como el factor de necrosis tumoral y el interferón- γ que pueden incrementar la expresión de MHC-I en la célula tumoral, favoreciendo la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos (Li et al. 1997; Tsujitani et al. 1995). Células tumorales que expresen MHC-II también pueden activar células T CD4+, sin embargo, lo más común es que las células presentadoras de antígenos que expresan MHC-II procesen y presenten proteínas derivadas de la muerte de células tumorales fagocitadas. Una vez procesadas y presentadas estas proteínas en el contexto del MHC-II, se activan las células CD4+ específicas de tumor y se desencadena la liberación de citoquinas (Tsujitani et al., 1995).

2.1.1.3. Células NK

Poseen una importante capacidad de lisis de células tumorales *in vivo* e *in vitro* (Whiteside and Herberman, 1990). Estas células pueden ser activadas por el reconocimiento directo de los tumores o por el efecto de las citoquinas producidas por los linfocitos T específicos de tumor (interferones, TNF, IL-2 e IL-12). Por esta razón, la inmunidad antitumoral mediada por células NK depende de la estimulación correcta de las células T y de los macrófagos

productores de estas citoquinas (Itoh et al. 1987; Whiteside and Herberman, 1990).

2.1.1.4. NKT

Estas células actúan en la respuesta citotóxica frente a células de melanoma directamente a través de la unión de su TCR con el ligando CD1d de la célula diana, o indirectamente mediante la producción de IL-2 activando la citotoxicidad de las células NK (Metelitsa et al. 2001). Los estudios *in vitro* han demostrado que el efecto antiproliferativo de las células V α 24⁺ NKT se debe fundamentalmente a la secreción de Interferón- γ e IL-12 por estas células y no a un efecto directo de las células NKT (Kikuchi et al. 2001). Se ha propuesto que las posibles funciones de las células NKT sean la de proporcionar una rápida ayuda a la respuesta inmune celular (a través de la secreción de interferón- γ) y la de colaborar en la respuesta mediada por anticuerpos (a través de la secreción de IL-4) (Seo et al. 2002). De este modo representarían un nexo de unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa.

2.1.1.5. Macrófagos

Actúan como mediadores celulares de la inmunidad antitumoral. Al igual que las células NK, los macrófagos expresan receptores Fc γ y podrían reconocer células de melanoma recubiertas por anticuerpos favoreciendo así su fagocitosis.

2.1.2. Mecanismos efectores solubles

Los factores solubles cuya acción se ha demostrado más efectiva frente al desarrollo del melanoma son la IL-2 y el interferón- α .

2.1.2.1. IL-2

Es una citoquina que juega un papel muy importante en la regulación del sistema inmune. Esta molécula es un factor de crecimiento de linfocitos T así como un factor de activación celular. Por otro lado, activa y estimula el crecimiento de las células NK. La IL-2 además de estimular células efectoras, estimula la secreción de otras citoquinas por activación de linfocitos T y monocitos, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , factor estimulador de colonias de células granulocito-macrófago (GM-CSF) e IFN- γ . La IL-2 ha sido eficaz en

la regresión tumoral en el 10-15 % de los enfermos de melanoma (Atkins, ;Mavroukakis et al.).

2.1.2.2. Interferón- α

Esta citoquina puede inhibir directamente la proliferación de células normales y tumorales *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, aumenta el potencial lítico de células NK, aumenta la expresión de MHC-I y disminuye la de MHC-II. También se ha observado que ejerce una actividad moduladora de la actividad de los linfocitos T generando linfocitos T citotóxicos (Padovan et al. 2002). Tiene un efecto antagonista frente a IL-4 en la producción de inmunoglobulinas y selección de su isotipo.

En pacientes con mieloma que reciben el tratamiento con IFN-alfa2b se ha comprobado un descenso del porcentaje de células NK, sin embargo, la actividad NK no se vió afectada (Millar et al. 1996). En aquellos enfermos de melanoma con un alto grado de malignidad del tumor, el tratamiento con altas dosis de IFN-alfa2b mejora la supervivencia de estos pacientes en un 25–30 % de los casos (Eggermont, 2002). El tratamiento con IFN-alfa2b en pacientes de VIH ha demostrado que mantiene constante el porcentaje de células CD4+ reduciendo la aparición de enfermedades oportunistas (Rivero et al. 1994). El tratamiento *in vitro* con esta citoquina demostró que es un potente acelerador de la maduración de células dendríticas que podría explicar el éxito que tiene en el tratamiento del cáncer y en la infección viral (Radvanyi et al. 1999) .

2.2. ANTÍGENOS TUMORALES ASOCIADOS A CÉLULAS DE MELANOMA

La identificación de antígenos tumorales se ha dirigido fundamentalmente a la obtención de antígenos reconocidos por CTLs específicos de tumor presentados en el contexto del MHC-I. Actualmente, el papel de células T CD4+ restringidas por el MHC-II está aumentando en importancia, y la lista de epitopos clase II específicos de células de melanoma se está incrementando rápidamente (Zeng et al. 2001) (Mitchell, 2002a). El estudio de los epitopos presentados por el MHC-I y MHC-II de células de melanoma permitiría diseñar una inmunoterapia específica frente a este tumor (Yamana and Itoh, 2000).

Muchos trabajos han demostrado la presencia de CTLs específicos de melanoma infiltrados en tumores, en sangre periférica y en metástasis de piel (Pittet et al. 2001). Sin embargo, a pesar de que los resultados demuestran una respuesta activa específica antitumoral, siguen sin estar bien definidos los mecanismos por los cuales los CTLs específicos de melanoma son capaces de retardar la progresión del tumor.

Los antígenos tumorales asociados a células de melanoma se dividen en: antígenos asociados a diferentes tumores, antígenos de diferenciación y antígenos específicos de tumor.

2.2.1. Antígenos asociados a diferentes tumores

Estos genes están expresados en células de melanoma y en varios tumores. No se expresan en tejidos normales a excepción de en los testículos durante la espermatogonia. Este grupo de antígenos incluye la familia de los MAGE, BAGE, GAGE y NY-ESO-1 (Boon et al. 1994;Castelli et al. 2000;Durrant, 1997;Mitchell, 2002b). El antígeno NY-ESO-1 está expresado en una alta proporción de tumores, en el caso de melanoma está expresado en el 45% de las lesiones, mientras que en tejidos normales no se expresa. Este antígeno parece ser el más inmunogénico de esta familia de antígenos (Zarour et al. 2002;Zeng et al., 2001).

2.2.2. Antígenos de diferenciación

Este grupo de proteínas incluye antígenos expresados en células de melanoma y en melanocitos normales. Este grupo de antígenos incluye la proteína Melan-A (de función desconocida), tirosinasa, glicoproteína 100, TRP-1 y TRP-2 (Boon et al., 1994;Castelli et al., 2000;Spagnoli et al. 1995) que son enzimas implicadas en la biosíntesis de la melanina.

De todos los antígenos de melanoma conocidos, Melan-A es el que más se ha estudiado. Una alta proporción de individuos HLA-A2 sanos y enfermos de melanoma presentan CTLs específicos para el epitopo 26-35 de Melan-A (Pittet et al. 1999). Se ha observado que los CTLs detectados en individuos sanos y muchos enfermos de melanoma tienen un fenotipo naive o virgen, mientras que el fenotipo activado sólo se ha observado en pacientes con la enfermedad más avanzada (Valmori et al. 2002).

2.2.3. Antígenos específicos de tumor

Estos antígenos pueden originarse como consecuencia de mutaciones puntuales en genes normales y son expresados únicamente en el tumor en el que fue identificado, ya que es muy improbable que la misma mutación suceda en tumores diferentes. Los modelos en ratones han demostrado que estos antígenos son los más inmunogénicos en comparación con los otros grupos (Kim et al. 2002). Este grupo contiene alguna de las mejores dianas para la inmunoterapia, sin embargo, como las mutaciones puntuales que suceden son diferentes en diferentes individuos, la inmunoterapia es difícil de aplicar, ya que sólo puede ser utilizada frente a los tumores originales para los que se diseñó.

2.3. COESTIMULACION DEL LINFOCITO T

Las células T juegan un importante papel en la iniciación y regulación de la respuesta inmune. La unión del TCR con el MHC y una segunda señal son necesarias para la activación completa de la célula T. La unión de las moléculas coestimuladoras del linfocito T con sus ligandos específicos permiten la transducción de señales al interior de la célula. Estas señales actúan de forma sinérgica con las señales inducidas por el TCR para aumentar la activación de la célula T. La señal coestimuladora está fundamentalmente mediada por la molécula de superficie CD28. En el linfocito T, la molécula CD28 promueve la activación celular interaccionando con los ligandos de la familia B7 (B7-1 o CD80 y B7-2 o CD86) que están expresados en las células presentadoras de antígenos. La activación mediada por moléculas coestimuladoras incrementa la expresión de citoquinas, la proliferación, la diferenciación celular, la adhesión y la migración (Greenfield et al. 1998a). En el caso del linfocito T citotóxico además aumenta su capacidad citotóxica (Chen et al. 1993).

La molécula CD28 forma parte de una familia de polipéptidos a la que también pertenece CTLA-4 (CD152). Mientras que CD28 fundamentalmente incrementa la expresión de citoquinas y la proliferación, la molécula CTLA-4 inhibe dichas funciones (Greenwald et al. 2002) mediante el bloqueo de la producción de IL-2 (Chambers et al. 2001).

2.3.1. Expresión de CD28 y CTLA-4 en linfocitos T:

La molécula CD28 se expresa en el 80 % de células CD8+ y en el 95 % de las CD4+ en adultos jóvenes y sanos. La expresión de esta molécula

disminuye en situaciones de activación crónica del sistema inmune y durante el envejecimiento (Pawelec et al. 1999). A pesar de que CD28 se expresa en un alto porcentaje de células T, posee una baja afinidad para los ligandos de la familia B7 (Abken et al. 2002; Alegre et al. 2001).

Al contrario que CD28, CTLA-4 no se encuentra en la superficie de células T en reposo. Se halla en compartimentos intracelulares, y en el momento de la activación se externaliza para expresarse en la superficie de la célula (Turcovski-Corrales et al. 1995). Esta molécula, a pesar de estar expresada en células activadas en un porcentaje muy bajo, presenta una afinidad muy alta para los ligandos de la familia B7 (Chambers et al., 2001).

2.3.2. Expresión de CD80 y CD86:

Los ligandos de CD28 y CTLA-4 son las moléculas de la familia B7. Esta familia está formada por las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). Los estudios que se han realizado con la molécula CD86 indican que esta molécula podría estar implicada en la fase inicial de la respuesta de la célula T. La molécula CD80, en cambio, parece predominar en las respuestas inflamatorias crónicas, como se ha observado en algunos modelos de enfermedades autoinmunes (Guinan et al. 1994; Schultze et al. 1996).

La molécula CD80 no se expresa en células presentadoras de antígeno en reposo, sin embargo, tras la estimulación a través del receptor CD40L, mediante citoquinas como IL-4 e Interferón- γ o mediante la adición de mitógenos se produce un incremento de CD80 y CD86 en la superficie de células presentadoras de antígeno (Hathcock et al. 1994). En el caso de células dendríticas se observa que la IL-10 regula negativamente la expresión de CD86 y no así el CD80 (Buelens et al. 1995). La molécula CD86 se encuentra en baja proporción en la superficie de monocitos en reposo y en células dendríticas. Tras la activación, la cinética de inducción en la expresión de CD86 (24 horas) es mucho más rápida que la de CD80 (48-72 horas) (Lenschow et al. 1996).

La importancia de las moléculas coestimuladoras en el desarrollo de una adecuada respuesta inmune, se pone de manifiesto en los estudios de la biología del trasplante. Se ha demostrado que el bloqueo de las vías de coestimulación

puede tener un impacto significativo en el trasplante de órganos para inducir la anergia en células T y prevenir de ese modo el rechazo (Schultze et al., 1996)

2.3.3. Coestimulación en la respuesta inmune antitumoral:

Como ya se ha comentado antes, en pacientes de melanoma se ha observado la existencia de linfocitos T citotóxicos específicos para antígenos asociados a tumor. Los estudios *in vitro* demuestran que estos linfocitos T requieren de la activación de moléculas coestimuladoras para generar un alto número de linfocitos T específicas de tumor (Fenton et al. 1998b). Por otro lado, los estudios *in vivo* demuestran que en la mayoría de los pacientes las células tumorales no son eliminadas por las células del sistema inmune, una de las causas podría ser la pérdida de expresión de ligandos de las moléculas coestimuladoras en células de melanoma que impiden la coestimulación del linfocito T para su activación completa.

Inducir la expresión de los ligandos de las molécula coestimuladoras en células tumorales podría proporcionar la señal coestimuladora necesaria para permitir a los linfocitos T una activación completa de la respuesta inmune antitumoral. Sería necesario un estudio profundo de las moléculas coestimuladoras y de sus ligandos en células tumorales para definir nuevas estrategias en la aplicación de inmunoterapia en estos pacientes (Mulcahy et al. 2002).

A continuación, se comenta el papel de la coestimulación en la respuesta inmune frente a células de melanoma. Se comentan por un lado, la expresión de ligandos de moléculas coestimuladoras en células de melanoma, y por otro, la coestimulación de linfocitos T en el reconocimiento de células de melanoma.

2.3.3.1. Expresión de ligandos de moléculas coestimuladoras en células de melanoma

En experimentos *in vitro* se ha comprobado que las células de melanoma inducen una respuesta inmune específica de células T muy débil (McCarthy et al. 2000). La ausencia de ligandos de moléculas coestimuladoras en células de melanoma provoca un fallo en la inducción de la proliferación y diferenciación de las células T que resulta en una tolerancia al estímulo antigénico. La inducción de ligandos de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 o CD48 en células tumorales permitiría un aumento de las vías de coestimulación para

potenciar una respuesta inmune específica frente células de melanoma (Mackensen et al. 1999).

Los ensayos *in vitro* con células de melanomas oculares transfectadas con el gen CD80 han demostrado que aumenta la capacidad de estimular la proliferación y la estimulación de las células T de sangre periférica (Mulcahy et al., 2002). También se ha visto que la expresión de CD80 y CD86 en la superficie de células de melanoma disparan la citotoxicidad de células NK a través de una interacción en la que parecen no intervenir ni CD28 ni CTLA-4 (Wilson et al. 1999). Por tanto, la expresión de moléculas coestimuladoras en células de melanoma permite una excelente estimulación del linfocito T específico, induciendo la proliferación, la producción de citoquinas, favoreciendo la adhesión y la actividad citolítica (Fenton et al. 1998a).

2.3.3.2. Coestimulación del linfocito T en el reconocimiento de células de melanoma

Como ya se ha comentado antes, el modelo de activación de la célula T requiere dos señales. La primera requiere el reconocimiento y unión del receptor de la célula T al complejo molécula de histocompatibilidad/antígeno tumoral presentado por la célula de melanoma. La segunda señal proviene de la unión de moléculas de la familia B7 (CD80 y CD86) con su receptor CD28 en el linfocito T y de citoquinas. Si falta la segunda señal, se puede inducir un estado de anergia en la célula T. La reversión de este estado es un proceso escalonado complejo el cual requiere además de la unión CD28-B7 una prolongada exposición a IL-2 y la estimulación del linfocito T a través de CD2. Recientemente se ha demostrado que CTLA-4 está incrementado en la superficie de células T después de la activación (Turcovski-Corrales et al., 1995). Esta molécula activa rutas inhibitoras que disminuyen la proliferación y citotoxicidad de células T. Por tanto, la expresión de CD28 y CTLA-4, y las interacciones con sus ligandos tienen la capacidad de regular positiva o negativamente la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos frente células de melanoma (Greenfield et al., 1998a)

2.4. RECEPTORES INHIBIDORES DE LA CITOTOXICIDAD

Los receptores inhibidores de la citotoxicidad específicos para la molécula MHC-I fueron descritos inicialmente en células NK. Las células NK reconocen el MHC a través de receptores en la superficie que liberan señales mayoritariamente inhibitorias de la función de las células NK. Cuando las células NK reconocen células dianas que han perdido la molécula MHC, actúan lisando estas células. La pérdida del MHC sucede frecuentemente en células tumorales y células infectadas por virus. Cada uno de estos receptores inhibidores está expresado en una subpoblación minoritaria de células NK. Esto permite que las diferentes poblaciones de células NK de un individuo detecten la pérdida de cualquier alelo de clase I en una célula (Moretta and Moretta, 1997). Por tanto, en contraste con las células T que poseen un reconocimiento restringido por el MHC, las células NK poseen un reconocimiento no restringido por el MHC que permite la defensa por el sistema inmune de células infectadas que han perdido la molécula MHC.

En el reconocimiento de células dianas por las células NK existe un balance entre señales positivas que inician la función efectora y señales negativas que previenen de la citolisis. Las señales positivas no son mediadas por un receptor en concreto, sino que diferentes receptores pueden estar actuando dependiendo del estado de activación de la célula NK y de la presencia o no de los respectivos ligandos en la célula diana.

2.4.1. Clasificación de los receptores NK específicos para MHC

Han sido identificadas dos familias de receptores NK estructuralmente diferentes. A continuación se muestran las características de cada una de ellas.

2.4.1.1. Superfamilia de las inmunoglobulinas

2.4.1.1.1. Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs)

Los KIRs se caracterizan por ser proteínas con 2 y 3 dominios de tipo Ig en su porción extracelular, y una masa molecular de 58 kDa o de 70 kDa. Según el número de dominios de tipo Ig se llaman KIR2D o KIR3D. Los receptores con una región intracitoplasmática larga poseen motivos ITIM responsables de su función inhibitoria y se denominan

KIR2DL y KIR3DL. La familia de los KIR está formada por más de 10 genes localizados en el cromosoma 19q13.4 de humano.

Las investigaciones desarrolladas hasta el momento han mostrado que los receptores KIR con la secuencia ITIM en su dominio citoplasmático, por ejemplo KIR2DL y KIR3DL, inhiben la lisis de células dianas que expresan un ligando MHC clase I apropiado. Por otra parte, los receptores KIR que no contienen ITIM, por ejemplo KIR2DS, pueden incrementar la lisis de las células dianas que expresen su ligando MHC clase I (Moretta et al. 2001). Además, en algunos trabajos se ha demostrado que la interacción entre receptores KIR en las células T y las moléculas HLA clase I en la célula presentadora de antígeno puede inhibir la producción de citoquinas. Los receptores KIR que poseen una cola citoplasmática corta pueden activar la citotoxicidad celular tanto en las células T como en las NK, posiblemente porque poseen un residuo cargado positivamente en la región transmembrana que interacciona con DAP12, que es una molécula adaptadora que contiene un ITAM (motivo de activación del inmunoreceptor basado en la tirosina (Moretta et al. 2001)

Los receptores KIR tienen como ligandos las moléculas de HLA de clase A, B o C a excepción de KIR2DL4 que su ligando es HLA-G1. Otros receptores como KIR2DL5 y KIR2DS3 poseen ligandos que por el momento no se conocen.

2.4.1.1.2. Immunoglobulin like transcripts

Otro grupo de receptores diferentes, pero que también pertenecen a la superfamilia de las Ig, son los ILT (Immunoglobulin Like Transcripts). Al igual que los KIR, los ILT se caracterizan por tener varios dominios tipo Ig (en su caso pueden ser 2 o 4) en su porción extracelular. A través de esos dominios los receptores ILT pueden interactuar con diferentes moléculas de HLA no clásicas como el HLA-G (Urosevic et al. 2002). A nivel cromosómico se localizan en la misma región 19q13.4 que los genes KIR.

De acuerdo con la estructura de las moléculas se distinguen tres grupos: en el primer grupo están los receptores que poseen una cola citoplasmática larga con ITIM asociado, en el segundo grupo están los receptores que poseen una cola citoplasmática corta sin motivos ITIM, y en el tercer grupo están las proteínas que no poseen región transmembrana y puede representar receptores solubles (Natarajan et al. 2002).

Se ha mostrado en varios estudios que miembros de la familia ILT se expresan en monocitos, macrófagos, células dendríticas, algunas células B, células NK y en subpoblaciones de células T CD8⁺ (Urosevic et al., 2002)

2.4.1.2. Superfamilia lectinas tipo C

La segunda familia de receptores que reconocen a los antígenos HLA clase I. Está compuesta por un heterodímero formado por las moléculas CD94/NKG2. Estos receptores son heterodímeros con dominios de lectinas tipo C, unidos por puentes disulfuro, compuestos por una subunidad común invariante, CD94, que está unida a diferentes glicoproteínas codificadas por los genes de la familia NKG2 (Lopez-Botet et al. 2000). Las moléculas que forman este complejo heterodimérico, desde el punto de vista estructural, son glicoproteínas transmembrana tipo II con un dominio de lectina tipo C en el extremo carboxiterminal de cada cadena. Las glicoproteínas NKG2 no pueden expresarse en la superficie de la membrana celular a menos que estén unidas a la glicoproteína CD94. Por esta razón, se piensa que la molécula CD94 puede funcionar inicialmente como chaperona para permitir el transporte de receptores NKG2 en la superficie celular.

CD94/NKG2A posee motivos ITIM y actúa como receptor inhibidor de la citotoxicidad (Lopez-Botet et al., 2000). El ligando de la molécula NKG2A es el HLA-E. La molécula HLA-E es una molécula de HLA no clásica que presenta péptidos derivados de la secuencia señal de otras moléculas HLA. La naturaleza del péptido unido a la molécula HLA-E influye en su interacción con el receptor CD94/NKG2A (Brooks et al. 1999). Por su parte, NKG2D no pertenece estrictamente a la familia NKG2 y no forma dímero con CD94, es un receptor

activador y tiene como ligandos a los receptores MICA, MICB y ULBPs (Borrego et al. 2002).

Por otro lado, la molécula NKG2C actúa como receptor activador de la citotoxicidad y al igual que NKG2A tiene como ligando a la molécula HLA-E.

2.4.2. Expresión de receptores reguladores de la citotoxicidad en células T

Aunque los receptores inhibidores fueron inicialmente descritos en células NK, estas moléculas son expresadas por algunas subpoblaciones de células T. En linfocitos T, la expresión receptores inhibidores y de receptores activadores asociados a células NK está mayoritariamente asociada a linfocitos T citotóxicos. Esta expresión se considera como un mecanismo regulador de la función citotóxica de linfocitos T citolíticos efectores.

A continuación se exponen las características fenotípicas de las células T que expresan receptores reguladores de la citotoxicidad y del balance que existe entre receptores activadores e inhibidores.

2.4.2.1. Fenotipo de células T que expresan receptores reguladores de la citotoxicidad

La expresión de estos receptores asociados normalmente a células NK está presente en subpoblaciones de células T CD8⁺ con un fenotipo activado, en células T $\gamma\delta$, en linfocitos T intraepiteliales y en células NKT. En general, las células T CD8⁺ que expresan receptores inhibidores y activadores muestran en su superficie marcadores indicativos de una activación previa (CD45RO, CD29, CD44, CD18, CD57, CD56) y la pérdida de marcadores indicativos de un fenotipo virgen (CD28 y CD27) (Ugolini et al. 2001). Estos datos sugieren que la expresión de receptores con la capacidad de regular la actividad citotóxica del linfocito T aparece como consecuencia de una estimulación antigénica previa.

2.4.2.2. Balance de receptores inhibidores/activadores en células T

La función de células NK y células T está regulada por un complejo equilibrio entre señales activadoras e inhibidoras. La expresión

de receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas y de receptores de lectinas tipo C en la superficie de los linfocitos T CD8⁺ regulan la función citotóxica y la producción de citoquinas de estas células (Moretta et al., 2001). Cuando una célula T reconoce una célula presentadora, se inician señales de activación que son transmitidas a través del TCR y las moléculas coestimuladoras. En este reconocimiento se activan inmediatamente los receptores inhibidores transformándose en funcionalmente competentes. Si el complejo MHC-péptido está presente en la superficie de la célula presentadora que ha iniciado la señal positiva, el receptor inhibidor en la célula respondedora transmitirá señales negativas que bloquean la respuesta interfiriendo las señales estimuladoras (D'Andrea et al. 1996). Por tanto, la respuesta de la célula T dependerá finalmente de la intensidad de la señal inhibidora y de la intensidad y la contribución de moléculas activadoras. Se ha propuesto que la expresión de receptores inhibidores podría proporcionar un mecanismo de tolerancia frente antígenos propios, y la ausencia de estos receptores podría desembocar en enfermedades autoinmunes (Long, 2002a).

Se ha observado que ciertas citoquinas pueden regular la expresión de estos receptores en linfocitos T activados. La inducción de receptores inhibidores podría representar uno de los mecanismos utilizados por ciertas citoquinas para modular la respuesta inmune. Se ha observado que citoquinas como TGF- β e IL-10 inducen la expresión de CD94/NKG2A en células CD4 (Romero et al. 2001), esta inducción podría ser la causante del efecto antiproliferativo e inhibidor que tienen estas dos citoquinas.

2.4.2.3. Expresión de receptores inhibidores en la respuesta antitumoral

Los primeros estudios de expresión de receptores inhibidores en linfocitos T citotóxicos demostraron que la subpoblación CD28⁻ expresa estos receptores en una proporción muy variable (Speiser et al. 1999b). Se pensaba que la expresión de estos receptores podría provocar una insuficiente activación de los linfocitos T específicos de tumor en

durabilidad e intensidad permitiendo el escape tumoral (Speiser et al. 1999a). En estudios posteriores se demostró la presencia de receptores inhibidores en linfocitos T citotóxicos específicos de células de melanoma (Huard and Karlsson, 2000; Noppen et al. 1998; Vetter et al. 2000), y en los ensayos funcionales con linfocitos T específicos que expresan el dímero CD94/NKG2A se observó que el bloqueo de CD94 incrementa la lisis de la célula de melanoma (Speiser et al., 1999a). Estos descubrimientos sugieren que el incremento en la expresión de receptores inhibidores podría interferir en la respuesta antitumoral específica.

Los estudios de la expresión de MHC-I en células tumorales demuestran la importancia que ésta tiene en el reconocimiento mediado por linfocitos T citotóxicos y células NK. En teoría, las células NK son capaces de matar células tumorales sin la necesidad de la expresión del MHC-I, sin embargo, está claro que en los tumores existe un mecanismo de escape a la destrucción de estas células. Por esta razón se piensa que las moléculas HLA no clásicas como HLA-E y HLA-G podrían estar jugando algún papel importante permitiendo la evasión de la respuesta antitumoral. Los estudios que se están realizando con el HLA-G confirman la expresión de esta molécula en la superficie de células de melanoma inhibe la citotoxicidad de células NK y de linfocitos T favoreciendo la progresión del tumor (Adrian et al. 1999; Paul et al. 1999).

Hay que decir que los resultados de los estudios de la expresión de HLA-G en células tumorales están siendo contradictorios (Frumento et al. 200; Real et al. 1999; Urosevic et al., 2002), sin embargo, lo que sí parece claro es que cualquier cambio en la expresión de las moléculas MHC-I de las células tumorales tiene un gran impacto en la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T y NK (Ruiz-Cabello et al., 1991).

2.4.3. Otros receptores asociados a células NK

2.4.3.1. CD56

El antígeno CD56 (N-CAM) es una isoforma de la molécula de adhesión neuronal humana y es considerado ligando homotípico. Consiste en una glicoproteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Ni su actividad bioquímica ni su función celular han sido identificadas. A pesar de su función desconocida, existen estudios previos que sugieren que esta molécula podrá mediar interacciones entre células NK y células diana (Whiteside and Herberman, 1990).

En humanos, CD56 representa el prototipo de marcador de células NK y también se encuentra en subpoblaciones de células CD4+ y CD8+. Las células NK y T expresan de forma predominante un producto de CD56 que tiene un peso molecular de 140 KDa, el cual contiene seis sitios potenciales para glicosilación modificada de forma extensiva por ácido polisiálico.

2.4.3.2. CD57

CD57 es una glicoproteína muy similar a CD56. Está presente en células del sistema nervioso y en subpoblaciones de células NK y linfocitos T. La función de CD57 en células NK aún no se conoce, mientras que en células T la expresión de CD57 sucede en fases tardías de la diferenciación y hay evidencias de que pueda suprimir la respuesta mediada por células T. La expresión de CD57 en células T se asocia con la pérdida de CD28 y con una baja respuesta proliferativa. En enfermos de VIH y de citomegalovirus hay un alto porcentaje de células T CD57+.

2.4.3.3. CD16

La molécula CD16 es el receptor de baja afinidad FCRIII en células NK que se une a células diana (opsonizadas) recubiertas de anticuerpo y a señales a través de subunidades asociadas que contienen un inmunoreceptor basado en motivos de activación de tirosinas (ITAMs) para dirigir la citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC). La mayoría de las células NK CD56 brillantes pierden la expresión de CD16 o se hace mínima, sin embargo las células CD56dim son prácticamente en un 95% positivas para CD16. Las diferencias en los niveles de expresión de CD16 tienen consecuencias funcionales para la

ADCC de las subpoblaciones NK. La expresión de CD16 está descrita tanto en células NK como en células T (Warren and Kinnear, 1999).

Las células NK no cambian de inmunoglobulinas o de genes TCR, y además, ni el Ig ni el complejo TCR/CD3 está expresado en la superficie celular (a excepción de la cadena zeta(ζ)). Ortaldo y col, han documentado que existe mucha similitud entre la señalización mediada por TCR y mediada por el receptor Fc de Ig G. Este receptor Fc de células NK (CD16) utiliza una cadena descrita en asociación con el TCR, la cadena z. Además CD16 activa a una proteína tirosín kinasa PTK no receptora y z es fosforilada en los residuos tirosina, como ocurre en la activación del TCR. La inhibición de la PTK bloquea tanto la señalización mediada por TCR como a la señalización, asociada al receptor Fc.

2.4.3.4. CD244

La molécula CD244 es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en todas las células NK y en subpoblaciones de células T, monocitos y basófilos. Está implicada en la activación de células NK y en la lisis de células diana CD48+ (Bottino et al. 2002). La expresión de CD244 en células de fenotipo activado/memoria sirve como ligando a células CD48 proporcionando una señal coestimuladora (Kambayashi et al. 2002). Según Speiser et al. la fracción de células CD8+ CD244+ corresponde a células con una alta expresión de perforina, alta producción de IFN- γ y disminución de CCR7, y en enfermos de melanoma los linfocitos T específicos para el antígeno Melan-A/MART-1 de fenotipo virgen no expresan CD244, mientras que los linfocitos T específicos que se diferencian *in vitro* hay un aumento paralelo de la expresión de CD244 (Speiser et al. 2001).

2.5. ESTRATEGIAS DE EVASIÓN AL SISTEMA INMUNITARIO

A continuación se exponen brevemente las principales estrategias que favorecen el escape de las células de melanoma del control inmunológico del huésped.

2.5.1. Autotolerancia a antígenos de melanoma: Los linfocitos T reconocen como propios los antígenos presentados por células tumorales (Kawakami et al. 1996; Takahashi et al. 1988).

2.5.2. Modificación del MHC: En célula de melanoma existe un descenso en la expresión del MHC-I (Ferrone and Marincola, 1995). Otras modificaciones que tienen lugar son la expresión defectiva de componentes citoplasmáticos en la presentación del MHC como pueden ser LMP2 y LMP7 que participan en el procesamiento del antígeno y TAP1 y 2 que intervienen en el transporte al retículo endoplásmico (Kageshita et al. 1999; Kamarashev et al. 2001 ; Seliger et al.). Recientemente se ha observado que en algunas células de melanoma existen mutaciones en la β 2-microglobulina (Perez et al. 1999), componente del MHC-I que disminuyen la expresión del MHC-I (Dimaano et al. ; Kageshita et al., 1999).

2.5.3. Producción de citoquinas: Las células de melanoma secretan citoquinas y factores de crecimiento que inducen la proliferación celular, la angiogénesis, la síntesis de moléculas de adhesión y la resistencia a proteínas inhibitoras de la proliferación celular (Slominski et al. ; Teicher,).

La secreción de IL-10 además de ser un factor de crecimiento autocrino para células de melanoma, y ejercer una acción inmunosupresora, disminuye la expresión de moléculas de clase I y II del MHC, así como de ICAM-1, pudiendo disminuir la eficacia de la respuesta inmune. En pacientes con melanoma, se ha encontrado que las células dendríticas del huésped funcionan de forma defectuosa, posiblemente por la inmunosupresión producida por el tumor, mediada por la síntesis de IL-10 (Steinbrink et al. 1999). Por tanto, la IL-10 secretada constitutivamente por las células tumorales podría producir anergia inmunológica.

El factor transformante de crecimiento beta ($TGF-\beta$) es una citoquina inmunosupresora que inhibe la producción de otras citoquinas que estimulan la respuesta inmune. Se ha observado que en fase avanzada del desarrollo tumoral el $TGF-\beta$ es secretado activamente por células tumorales contribuyendo a aumentar la proliferación celular, la invasión y metástasis y disminuyendo la respuesta inmune antitumoral (Beck et al. ; Gorelik and Flavell, ; Pasche,).

2.5.4. Expresión de HLA-G en células de melanoma: La interacción de HLA-G con receptores inhibidores de la citotoxicidad puede potenciar la capacidad del melanoma para evadir la respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos y células NK {HLA-G and its KIR ligands in cancer--another enigma yet to be solved? ID: 2}. Sin

embargo algunos autores afirman que la expresión de HLA-G está restringida a un reducido número de tumores (Polakova and Russ, 2000) (Frumento et al., 2000).

2.5.5. Defectos en la regulación de la apoptosis: Si una célula normal no sufre apoptosis se perpetúa y puede originar un clon tumoral. En células de melanoma se ha observado que tienen la capacidad de evadir la respuesta TRAIL (apoptosis asociada a TNF- α) (Hersey and Zhang, 2001). También en células de melanoma se ha observado la expresión de FLIP (FLice Inhibitory Protein), que es una proteína inhibidora de la caspasa 8 que interviene en la apoptosis mediada por Fas. La proteína FLIP se considera un inhibidor de apoptosis que se expresa preferentemente en músculo y tejidos linfoides. Los melanocitos normales en condiciones basales no expresan FLIP, en cambio las líneas celulares y metástasis cutáneas de melanoma expresan niveles detectables de FLIP que se han relacionado con la tumorigénesis (Bullani et al.).

2.5.6. Defecto en la síntesis de óxido nítrico: Las células no metastáticas tienen una alta expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y producen altos niveles de óxido nítrico. Las células metastáticas sin embargo tienen una baja expresión de iNOS. La expresión de esta enzima en células tumorales está asociada con la apoptosis, la supresión de tumorigénesis y la regresión de metástasis (Xie et al. 1996) (Xie and Fidler, 1998).

2.5.7. Defectos en la coestimulación de los linfocitos T: La pérdida de ligandos de moléculas coestimuladoras en la superficie de la células de melanoma y la disminución de moléculas coestimuladoras en la superficie del linfocito, reduce la respuesta inmune mediada por células T (Abken et al. ;Antonia et al. 1998;Greenfield et al. 1998b;Liebowitz et al. 1998;Melero et al. 1997).

2.5.8. Expresión de receptores inhibidores: En células efectoras se ha demostrado que la presencia de receptores inhibidores de la citotoxicidad en la superficie de los linfocitos T citotóxicos y células NK ejerce un papel inmunomodulador de la respuesta frente células de melanoma (Cerwenka and Lanier, ;Long, 2002b;Miller, ;Miller, ;Moretta et al. ;Moretta et al.).

3. INMUNOTERAPIA: VACUNAS E INMUNOMODULADORES

Las vacunas contra el melanoma son el mejor tratamiento para mejorar la supervivencia en pacientes con la enfermedad avanzada. A continuación se describen los principales tipos de vacunas que se encuentran actualmente en uso o en estudio.

3.1. Vacunas derivadas de cultivo de células multivalentes

Las vacunas derivadas de cultivo de células multivalentes se producen tras el procesamiento de varias líneas de células de melanoma cultivadas *in vitro*. Son vacunas de células que no proceden del paciente. Con la mezcla de varias líneas se intenta que alguno de los antígenos sea compartido por las células tumorales del paciente. La ventaja de estas vacunas es que no es necesaria la obtención y el cultivo de células tumorales del propio paciente. La desventaja es que son vacunas poco eficientes, ya que probablemente buena parte de la respuesta inmune se organiza contra antígenos irrelevantes no presentes en el tumor del paciente. Estas respuestas podrían mejorarse con el empleo adecuado de adyuvantes o inmunomoduladores (Spitler,).

3.2. Vacunas de células autólogas

Las vacunas de células autólogas se preparan cultivando células de melanoma del propio paciente. Son de dos tipos: vacunas de células muertas y vacunas recombinantes de células autólogas (Nathan and Eisen, ; Wolchok and Livingston,). La ventaja de las células autólogas es que la mayor parte de los antígenos presentados proceden del propio paciente. La desventaja principal es la dificultad de obtener un número suficiente de células malignas viables.

3.3. Vacunas con células irradiadas

Requieren menor manipulación *in vitro* que las vacunas recombinantes. Tras obtener células del paciente, éstas se procesan y se inyectan con algún adyuvante. Las células inyectadas están irradiadas para dañarlas irreversiblemente, impidiendo su propagación. Una ventaja de las células irradiadas es su semejanza con las células tumorales del paciente. Las respuestas inmunológicas eficaces contra las células de la vacuna tienen mayor probabilidad de ser también eficaces para las células del tumor. Un tipo de vacuna de células muertas es la vacuna AVAX, en la que las células del paciente se procesan y tratan con dinitrofenol (Berd, 2002).

3.4. Vacunas de células con ADN recombinante

Las técnicas de ADN recombinante se emplean para modificar vacunas de células autólogas, con el fin de potenciar su inmunogenicidad. Por ejemplo, células de melanoma modificadas genéticamente que producen inmunomoduladores como IL-2, GM-CSF, u otras citoquinas.

3.5. Vacunas con péptidos

Las vacunas con péptidos se basan en el uso de secuencias de aminoácidos de las proteínas tumorales que han servido como blanco de la respuesta inmune en otros pacientes. El empleo de los epitopos peptídicos es, potencialmente, un método eficiente de inmunización, ya que sólo se emplean las porciones más inmunógenas de las proteínas (Parmiani et al. ;Weber,). Las desventajas de estas vacunas son que hasta el momento no existe una vacuna peptídica multivalente ya que actualmente se conocen muy pocos epitopos significativos.

Otro problema importante de estas vacunas es la restricción por MHC. Cada molécula MHC-I sólo puede unirse a un número limitado de péptidos. Esto significa que los péptidos a emplear en cada paciente probablemente sean distintos en función de su HLA, siendo necesario utilizar péptidos compatibles con los haplotipos HLA del paciente.

3.6. Vacunas de ADN "desnudo"

Se distinguen de las vacunas de ADN recombinante porque la transfección de ADN exógeno se produce *in vivo*, no siendo necesarias las células tumorales autólogas (Marchand et al. ;Sun and Schuchter,). Los inmunomoduladores u otras proteínas a expresar se introducen en la célula mediante un plásmido. Estos plásmidos se introducen en el tejido muscular o subcutáneo, donde transfectan las células del huésped creando una zona de expresión ectópica de la proteína. La proteína codificada por el plásmido puede estar constituida por varios epitopos antigénicos del tumor. También puede codificar inmunomoduladores que aumenten la inmunidad natural frente al tumor, como la IL-2, que serán liberados de forma continuada por las células transfectadas (Ackermann et al. 2002). En este segundo caso, la vacuna puede ser un complemento de otras vacunas o tratamientos. Podrían realizarse vacunas que produzcan ambos efectos: bien mediante plásmidos distintos inyectados en sitios

distintos, o plásmidos distintos inyectados juntos, o incluso mediante un único plásmido que codifique varias proteínas.

Una ventaja fundamental de este tipo de vacunas es que no requieren células tumorales autólogas o manipulaciones individualizadas del ADN. La desventaja es que al igual que en otros estudios e terapia génica la dificultad está mantener la expresión de la proteína codificada por el plásmido.

3.7. Vacunas de células dendríticas

A partir de sangre periférica y mediante estimulación *in vitro* con péptidos se obtienen células presentadoras de antígeno que se reinyectan en el paciente (Curiel-Lewandrowski and Atkins, ;Phan et al. ;Wang et al. ;Wolchok and Livingston,). La ventaja de este método es que utiliza células autólogas que se obtienen de la sangre periférica. La desventaja de este método son las mismas de las vacunas peptídicas, ya que los antígenos que se incuban con las células dendríticas no son multivalentes.

3.8. Inmunomoduladores

Los inmunomoduladores suelen emplearse por su capacidad para mediar las respuestas inmunes (Sondak, ;Spitler,). A continuación se exponen los que habitualmente se asocian a las vacunas.

3.8.1. GM-CSF

El factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) induce la transformación de las células dendríticas en células presentadoras de antígeno maduras. De esta forma aumenta la presentación de antígenos. Es uno de los adyuvantes más potentes conocidos. Se emplea como estrategia primaria (por ejemplo, como proteína expresada ectópicamente en vacunas recombinantes), o como adyuvante farmacológico inyectado junto a otros tipos de vacunas.

3.8.2. IL- 2

Se ha empleado para estimular linfocitos periféricos *in vitro* (terapia LAK) y linfocitos infiltrados en el tumor (terapia TIL). Se ha empleado también

en vacunas recombinantes de ADN para estimular localmente la respuesta inmune.

3.8.3. IL-12

La IL-12 interviene en la diferenciación de los linfocitos T helper en células del tipo Th1. Este tipo celular se considera más importantes en la defensa celular frente a tumores que los linfocitos Th2.

3.8.4. IFN- γ

Sus funciones principales son la activación de los macrófagos, el estímulo de los linfocitos B para producir anticuerpos, y el incremento de la expresión de MHC-I. Se ha empleado como tratamiento aislado y como adyuvante.

OBJETIVOS

Partiendo de la hipótesis que establece que: “en los linfocitos T de pacientes de melanoma existe una alteración en el balance señales de inhibición–activación de la citotoxicidad que es debida a la expresión de receptores NK inhibidores de la citotoxicidad y a la pérdida de moléculas coestimuladoras”, nos planteamos estudiar estas alteraciones que podrían favorecer el desarrollo tumoral en estos pacientes y establecer su correlación con el grado de diferenciación hacia linfocitos efectores/citotóxicos. Para ello, los objetivos individualizados que se establecieron en este trabajo fueron:

1. Diseño de un modelo “*in vitro*” para determinar el papel de la citotoxicidad mediada por CD28 en la lisis de células de melanoma CD80+: estudiar el efecto de la presencia de receptores inhibidores de la citotoxicidad.
2. Caracterización de linfocitos T citotóxicos en función de su fenotipo efector/memoria o fenotipo virgen en PBLs de enfermos de melanoma e individuos sanos: análisis comparativo de la expresión de moléculas coestimuladoras, estudio de la expresión de receptores asociados a células NK incluyendo receptores de HLA moduladores de la citotoxicidad y medida de marcadores de activación/diferenciación.
3. Análisis fenotípico de linfocitos T CD8 específicos frente al antígeno de melanoma Melan-A/MART-1 en sangre periférica: estudio de la expresión de moléculas coestimuladoras, receptores asociados a NK, marcadores de diferenciación/activación y moléculas efectoras de la citotoxicidad.
4. Estimulación *in vitro* de linfocitos T CD8 específicos frente al antígeno Melan-A/MART-1: análisis de moléculas coestimuladoras, receptores asociados a NK, marcadores de diferenciación/activación y de moléculas efectoras de la citotoxicidad.
5. Análisis funcional de linfocitos T CD8 Melan-A/MART-1 específicos: medidas de la secreción de Interferón- γ y de la actividad citotóxica frente a células de melanoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

1.1. Mantenimiento de líneas celulares de melanoma

La línea celular de melanoma M6/B7 transfectada con el gen CD80 fue cedida por Francine Jotereau, investigadora perteneciente al laboratorio de inmunología y dermatología de la Universidad de Nantes (Francia). Las células se cultivaron en un medio de cultivo RPMI 1640 complementado con 1 % glutamina, 1 % penicilina-estreptomicina, 10 % de suero fetal bovino y Geneticina (G418) 300 µg/ml para seleccionar el crecimiento de las células transfectadas.

1.2. Líneas celulares YT-Indy e YT-Indy-cl43

La línea YT-Indy es una sublínea de la línea celular YT establecida originalmente de un linfoma linfoblástico. Esta línea causa la lisis en células dianas transformadas por el virus de Epstein Barr a través de la unión de CD28 con las moléculas CD80 y CD86 de células diana (Teng et al. 1996). La línea YT-Indy-cl43 fue transfectada con el gen *cl43* en el vector de expresión pRSV5.neo (Tarazona et al. 2002). Este gen codifica para el receptor KIR2DL2, el cual interacciona específicamente con la molécula HLA-Cw3.

1.3. Líneas celulares 721.221 y 721.221-Cw3

La línea celular 721.221 es una línea celular transformada con el virus de Epstein Barr que no expresa HLA-I y es CD80+ (Markel et al. 2002). La línea celular 721.221-Cw3 es una línea transfectada con HLA-Cw3 que fue diseñada para ser utilizada en ensayos de lisis (Tarazona et al., 2002).

2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Para determinar la actividad citotóxica de las células efectoras se realizaron ensayos de lisis midiendo la liberación de ⁵¹Cr de las células diana. Durante 90 minutos y a 37 °C se incubaron 1 x 10⁶ células de células diana con 100 µCi de una solución de ⁵¹Cr (cromato sódico de CIS-biointernational). En los ensayos de lisis en los que se utilizaron como células diana a la célula de melanoma M6/B7 como presentadora del péptido Melan-A/Mart-1 (ELAGIGILTV), se realizó una preincubación de 90 minutos con 10 µM de péptido para que las células presentaran el antígeno. Después de dos lavados con PBS se resuspendió el sedimento en medio RPMI completo a una

concentración de 50000 células/ml. Se tomaron 100 µl de esta disolución y se añadió a triplicados de pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U.

Por otro lado, las células efectoras se resuspendieron en medio RPMI completo a una concentración de 4×10^6 células/ml. Se utilizó 100 µl de esta solución y se añadió a aquellos pocillos en los que se midió la lisis a un ratio 80:1. Para los pocillos con el ratio 40:1, 20:1 y 10:1 se realizaron diluciones seriadas.

Como control positivo se añadió 100 µl de Tritón X-100 al 1 % a las células dianas para obtener el valor de lisis máxima.

Como control negativo se añadió 100 µl de medio RPMI completo para medir la lisis espontánea de las células diana.

Para favorecer el contacto entre dianas y efectoras, se centrifugó la placa 30 segundos a 900 rpm y se dejó incubando a 37 °C durante 6 horas.

Para bloquear moléculas de superficie de células efectoras o células diana, se preincubaron las células con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal específico frente a las diferentes moléculas de superficie a analizar.

Tras 6 horas de incubación se centrifugó la placa 3 minutos a 900 rpm. Para determinar el ^{51}Cr liberado de las células diana, se recogieron 25 µl del sobrenadante de cada pocillo y se depositaron en filtros Spot-on. Se dejó secando el filtro y se humedeció con líquido de centelleo para medir la radiación en un contador de centelleo del tipo Betaplate 1205 (Wallac).

El análisis de los resultados se realizó haciendo la media de las cuentas por minuto de cada triplicado. El porcentaje de lisis específica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LISIS ESPECÍFICA} = \frac{\text{Lisis experimental} - \text{Lisis espontánea}}{\text{Lisis máxima} - \text{Lisis espontánea}} \times 100$$

3. ANTICUERPOS

3.1 Anticuerpos para fluorescencia directa

Conjugados con PE (Phycoerythrin), FITC (Fluorescein Isothiocyanate), PerCP (Peridinin Chlorophyll-a Protein), o APC (Allophycocyanin) se utilizaron los anticuerpos frente a CD3 (Leu-4), CD8 (SK1), CD4 (SK3), CD56 (NCAM16.2), CD28 (L293), CD45RO (UCHL-1), CD45RA (L48), CD16 (B73.1), CD16 (NKP15), NKB1

(DX9), CD161 (DX12), CD27 (L128), CD57 (HNK-1), CD80 (L307.4), CD86 (2331 FUN-1) suministrados por Becton Dickinson (Mountain View, California)

Los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC o PE suministrados por Pharmingen (San Diego, California) fueron los específicos frente a HLA-A,B,C (G46-2.6), CD28 (CD28.2), CD85 (GHI/75), CD94 (HP-3D9) y CD48 (TÜ145).

3.2. Anticuerpos para fluorescencia indirecta

El anticuerpo específico contra NKG2A (Z199) fue suministrado por Coulter-Immunotech (Marsella, Francia) y para su marcaje se utilizó el anticuerpo secundario IgG (F(ab')₂) anti-ratón marcado con Tricolor. El anticuerpo específico contra CCR7 (2H4) fue suministrado por Pharmingen y para su marcaje se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado Anti-IgM y posteriormente con estreptavidina conjugada con PE de Pharmingen.

3.3. Anticuerpos secundarios para fluorescencia indirecta

IgG (F(ab')₂) anti-ratón marcado con Tricolor suministrado por CALTAG (Burlingame, CA)

Anti-IgM anti-ratón marcado con biotina suministrado por Pharmingen (San Diego, California)

3.4. Controles de fluorescencia

Control isotipo IgG2a de ratón conjugado con FITC/PE

Control isotipo IgG2a de ratón conjugado con PerCP

Control isotipo IgG1 de ratón conjugado con APC

3.5. Anticuerpos para la separación inmunomagnética

Anticuerpo monoclonal anti-CD8 puro de Pharmingen.

Macs Goat Anti-Mouse IgG Microbeads suministradas por Miltenyi Biotec, Germany

4. SUJETOS DE ESTUDIO

Todos los sujetos seleccionados fueron informados y dieron su consentimiento para realizar el estudio según el Comité ético de ensayos clínicos.

Los enfermos de melanoma fueron seleccionados en el Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (España).

Para los estudios de inmunofluorescencia, se seleccionaron 9 individuos sanos con una media de edad de 36 ± 10 años y 19 enfermos de melanoma con una media de edad de 43 ± 11 años. Los enfermos de melanoma se dividieron en pacientes con metástasis y sin metástasis y pacientes tratados con Interferón alfa2b y sin tratar.

Los enfermos con metástasis (n=5) tenían una edad 45 ± 8 años. Los enfermos que no tenían metástasis (n=14) tenían una edad media de 42 ± 12 años. Los enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) tenían una edad media de 45 ± 4 años, y los no tratados (n=10) una media de 41 ± 14 años. A todos los individuos del estudio se les extrajo una cantidad de 18 - 24 ml de sangre venosa en tubos ACD.

Para las expansiones de los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos se seleccionaron 4 individuos sanos HLA-A*0201 a los que se les extrajo 45 ml de sangre venosa.

Para los cultivos *in vitro* de PBLs en presencia de Interferón alfa2b se seleccionaron dos individuos jóvenes sanos a los que se les extrajo 50 ml de sangre venosa.

5. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS

Se realizó la separación de linfocitos por gradiente de densidad a partir de sangre venosa. Se diluyó la sangre a temperatura ambiente en PBS V/V. En tubos universales de 30 ml se dispensaron cuidadosamente 7 ml de Ficoll (Histopaque-1077) y 21 ml de sangre diluida, centrifugándose a 3000 rpm a 10 °C durante 20 minutos. Posteriormente se extrajo la capa de células mononucleares situada en la interfase entre el Ficoll y el plasma, transfiriendo las células a tubos universales y lavando dos veces con PBS (1500 rpm durante 5 minutos). Las células obtenidas se resuspendieron en medio RPMI completo y se mantuvieron a 4 °C hasta ser utilizadas. Las células que no iban a ser utilizadas en el momento se almacenaron en N₂ líquido disueltas en una solución de FCS al 10 % de DMSO.

5.1. Aislamiento de la fracción CD8+

Un total de $40\text{-}50 \times 10^6$ células mononucleares obtenidas del aislamiento de linfocitos se resuspendieron en 300 µl de PBS y se incubaron 30 minutos a 4 °C en agitación con el anticuerpo monoclonal anti-CD8 puro a una concentración de 1 µg/ml.

Tras dos lavados se resuspendió el pellet en 200 µl de tampón Macs (ver tampones y soluciones) y se le añadió 50 µl de la solución comercial de Macs Goat Anti-Mouse IgG Microbeads. Se dejó incubar durante 30 minutos a 4 °C en agitación y a continuación se realizaron dos lavados con tampón Macs. El pellet se resuspendió en 1 ml de tampón Macs.

Para la separación magnética se utilizaron columnas estériles LS+/VS (Miltenyi Biotec, Germany) colocadas en el separador magnético Midi Macs (Miltenyi Biotec, Germany), se añadieron 3 ml de tampón Macs con objeto de equilibrar la columna y posteriormente se añadió la suspensión celular seguida de tres volúmenes de columna de tampón Macs.

El total de 10 ml que contenía la suspensión de células no marcadas (fracción negativa) fue recolectado en un tubo limpio y la fracción celular adherida a la columna (fracción positiva) se recogió añadiendo 5 ml de medio de cultivo RPMI completo a la columna previamente retirada del separador magnético y empujando el émbolo para que las microesferas se despegaran con más facilidad. Ambas fracciones fueron lavadas dos veces con tampón Macs.

La fracción CD8⁺ se utilizó para expandir linfocitos T CD8⁺ Melan-A/MART-1 específicos, y la fracción CD8⁻ se utilizó como células presentadoras de antígenos para estimular estos linfocitos.

6. ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

La fluorescencia se realizó con triple o cuádruple marcaje para estudiar la distribución de los diferentes receptores en las distintas series celulares linfoides y así poder definir las subpoblaciones linfocitarias.

6.1. Fluorescencia directa

Para la fluorescencia directa de antígenos de superficie, se incubaron de 5×10^5 a 10^6 células en 500 µl de solución de lavado para citometría (ver tampones y soluciones) añadiendo 15 µl/ 10^5 células de cada uno de los anticuerpos monoclonales conjugados con algún fluorocromo e incubando durante 30 minutos a 4 °C (DelaRosa et al. 2002). Tras un lavado con Facs Flow (ver tampones y soluciones) se mantuvieron a 4 °C hasta su adquisición.

6.2. Fluorescencia indirecta

Para la realización de fluorescencia indirecta se añadió a la suspensión celular $1 \mu\text{g}/10^6$ células de anticuerpo monoclonal puro. Se incubaron durante 30 minutos a 4°C y tras el lavado con FACS Flow se añadieron $2 \mu\text{l}/10^6$ células de anticuerpo secundario conjugado con Tricolor. Para el marcaje del CCR7 se añadió $2 \mu\text{g}/10^6$ células de anticuerpo secundario conjugado con biotina, se dejó incubando durante 30 minutos a 4°C y finalmente se incubó con la estreptavidina conjugada con el fluorocromo durante 30 minutos a 4°C (Valmori et al. 2002).

Las células se fijaron en una solución de PBS al 1 % de formaldehído para su posterior adquisición.

La fluorescencia para los controles negativos fue realizada de la misma forma pero utilizando las inmunoglobulinas de ratón específicas para cada fluorocromo.

6.3. Fluorescencia de moléculas intracelulares

Para las medidas del contenido intracelular de perforina se realizó primero la fluorescencia de los antígenos de superficie con anticuerpos conjugados con sus fluorocromos. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 1 % durante 40 minutos antes de realizar su permeabilización con saponina (S-7900 Sigma) al 0.1 % en PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS se incubaron las muestras con anticuerpos frente a perforina (δG9) (Pharmingen) conjugados con FITC junto con su control isotipo IgG 2b de ratón durante 30 minutos a 4°C (Tarazona et al. 2000). Una vez lavadas con PBS se almacenaron a 4°C para su posterior adquisición.

6.4. Fluorescencia de tetrámeros

Los tetrámeros que se utilizaron interaccionan con los linfocitos T CD8^+ específicos que reconocen el péptido Melan- A_{26-35} A27L (ELAGIGILTV) en el contexto del antígeno HLA-A*0201 (D'Souza et al. 1998; Ramirez-Montagut et al. 2000; Valmori et al. 2001). Fue necesario por tanto, realizar el tipaje de los individuos en estudio seleccionando los individuos HLA-A*0201 para el análisis mediante tetrámeros de los CTLs específicos. Se incubaron $10 \mu\text{l}/10^6$ de células mononucleares del tetrámero MART-1 conjugado con APC (Proimmune) durante 30 minutos a 37°C .

Tras un lavado, se realizaron las fluorescencias directas, indirectas o intracelulares con los anticuerpos monoclonales correspondientes según se describió con anterioridad.

6.5. Determinación de moléculas de superficie en líneas de melanoma

Las células de melanoma se separaron del sustrato sólido utilizando una solución de 0.05 % de tripsina (Gibco-BRL) disuelta en tampón HBSS a pH 7.5 (ver tampones y soluciones). Una vez separadas se realizaron dos lavados con PBS y mediante fluorescencia directa o indirecta se analizó la expresión de las moléculas de superficie.

6.6. Adquisición de células

Para la adquisición de las células se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson), calibrando los distintos parámetros con fluoroesferas para calibración (Calli-Brite Beads Becton Dickinson) según el programa Facs comp. 4.0 (Galiani et al. 1999).

Se procedió a la adquisición de 10000 células por tubo en el caso de fluorescencias directas, indirectas e intracelulares y de 10×10^5 a 20×10^5 en el caso de marcaje con tetrameros. Se seleccionaron los linfocitos viables conforme a los parámetros de tamaño y complejidad.

El análisis multicolor de los marcadores de superficie celular con el programa "Cell Quest" nos permitió realizar el análisis estadístico de las diferentes subpoblaciones.

7. CULTIVO DE PBLs CON INTERFERÓN alfa2b

A partir de $40\text{-}50 \times 10^6$ de PBLs se ajustó la concentración a 10^6 células / ml para cultivarlas en placas de 24 pocillos y se añadió 2 ml de dicha solución a cada pocillo. Las células control se cultivaron en presencia de medio RPMI completo + 50 U/ml de IL-2. Las células tratadas con Interferón alfa2b se cultivaron en presencia de medio RPMI completo + 50 U/ml de IL-2 + 10000 U/ml de Interferón alfa2b. Los días 0, 5, 10 y 15 se recogieron 10×10^6 células del cultivo para realizar las fluorescencias. Las células se adquirieron en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) como se ha descrito previamente.

8. TIPAJE HLA CLASE I DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

El tipaje se hizo mediante la técnica de PCR-SSP (basada en la amplificación específica de determinados alelos de clase I) (Dynal.SSP) en un termociclador Perkin Elmer. Esta técnica está funcionando de manera rutinaria en el laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

9. SINTESIS DE PÉPTIDOS

El péptido con la secuencia ELAGIGILTV fue sintetizado utilizando un sintetizador automático de péptidos (431 Peptide Synthesizer, Applied Biosystems, USA), purificado por HPLC de fase reversa. El péptido fue disuelto en DMSO a una concentración de 5 mg/ml. Dicho péptido fue cedido por cortesía del Dr. Fernando Barahona de la Universidad Autónoma de Madrid.

10. EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ Melan-A/MART-1 ESPECÍFICOS

Los CTLs Melan-A/MART-1 específicos se generaron a partir de PBLs de individuos con el tipaje HLA-A*0201. A las células mononucleares se les realizó la separación de la fracción de células CD8+ como previamente se ha descrito. Por otro lado, las células CD8- se utilizaron como células presentadoras de antígenos para estimular el crecimiento de la fracción CD8+. Estas células se incubaron en RPMI 1640 sin suero durante 2 horas a 37 °C con 10 µM de péptido (ELAGIGILTV). A continuación las células con el péptido se irradiaron a 3000 radianes. La mitad de estas células se congelaron y la otra mitad se ajustó al volumen apropiado para añadirlas a la fracción de células CD8+. Las células irradiadas presentadoras del péptido ELAGIGILTV y las células CD8+ se cocultivaron a una concentración de 2 x 10⁶ células/ml en un volumen de 2 ml en placas de cultivo de 24 pocillos. El día 7 de cultivo se realizó una segunda estimulación con el resto de células irradiadas. El medio de cultivo que se utilizó para generar CTLs específicos fue RPMI 1640 complementado con 20 % de suero humano, 1 % de glutamina, 1 % de penicilina, 1 % aminoácidos no esenciales, 10 ng/ml de IL-7 y 100 U/ml de IL-2. El resultado de la expansión y el análisis fenotípico de estas células se realizó mediante fluorescencia con tetrámeros como se ha descrito previamente.

11. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ MEDIANTE ELISPOT

Para obtener información complementaria sobre los linfocitos T CD8⁺ Melan-A/MART-1 específicos, se procedió al ensayo ELISPOT para IFN- γ . Con este ensayo comprobamos la funcionalidad de los linfocitos T CD8⁺ específicos mediante el cálculo del porcentaje de células secretoras de IFN- γ (células formadoras de puntos) con respecto a la población de linfocitos T CD8⁺ específicos. La frecuencia de linfocitos específicos frente al péptido ELAGIGILTV fue determinada mediante ELISPOT.

Las placas para ELISPOT (Millipore) se incubaron toda la noche con una concentración saturante de anticuerpo frente a IFN- γ humano (Mabtech ELISPOT for Human Interferon- γ).

Tras la incubación se procedió a realizar 6 lavados con 100 μ l de tampón fosfato salino suplementado con el 0.5 % de suero fetal bovino.

En pocillos por triplicado se incubaron 50000, 25000 y 12500 células CD8⁺ previamente purificadas de la expansión *in vitro*. Como control, se utilizaron triplicados de PBLs del mismo individuo que se incubaron con 10 μ M del péptido Melan-A/MART-1 durante el tiempo que duró el ensayo. El control positivo del ensayo fue un triplicado de 3000 células mononucleares con 1 μ g / ml de PMA (Forbol 12-Miristato 13-acetato, SIGMA). El control negativo fueron 3000 células mononucleares sin estímulos. Las células se incubaron 12 horas a 37 °C y 5 % de CO₂.

Las células se retiraron de las placas y a éstas se les añadió un segundo anticuerpo biotinilado frente a IFN- γ humano incubándolo durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras los lavados (6 x 100 μ l) con PBS suplementado con 0.5 % de suero fetal bovino se añadió fosfatasa alcalina unida a estreptavidina y se incubó durante 120 minutos a temperatura ambiente. Para revelar se utilizó BCIP/NBT (SIGMA) como sustrato revelador, y se dejó incubando hasta que aparecieran las manchas (10 minutos aproximadamente). La reacción se detuvo lavando con 200 μ l / pocillo de agua destilada y filtrada.

12. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ EN ENSAYOS DE LISIS (CITOSPOT)

Para determinar la liberación de IFN- γ en un ensayo de lisis, se realizaron los ensayos de citotoxicidad en condiciones similares a las que vienen indicadas en el apartado 2, las únicas condiciones que se modificaron fueron el tiempo del ensayo que en este caso fue de 12 horas y la ausencia de marcaje con ^{51}Cr de las células diana. Para que la célula de melanoma M6/B7 presentara el péptido, Melan-A/MART-1 se preincubó 90 minutos a una concentración 10 μM .

Los ensayos se realizaron en placas de ELISPOT de 96 pocillos y una vez terminado el ensayo se determinó la producción de IFN- γ según viene indicado en el apartado 12. Como control negativo se utilizaron células dianas sin preincubar con el péptido Melan-A/MART-1.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de todos los datos se utilizó el programa de estadística SPSS 9.0. Con este programa se calcularon los promedios y las desviaciones estándar de los diferentes grupos de datos. Para el análisis comparativo entre 2 grupos de datos se aplicó el cálculo de la t de Student. Para comparar 3 grupos de datos se aplicó el test de ANOVA. Para el análisis comparativo se determinó además si las distribuciones eran o no paramétricas. Se consideraron diferencias significativas los valores de $p \leq 0.05$.

14. REACTIVOS

14.1. Tampones y soluciones

Tampón fosfato salino pH 7.3 (Phosphate buffer saline; PBS): Disolución en agua destilada mediante agitación de 1 tableta de PBS en 100 ml de agua destilada, autoclavando la solución.

Solución de lavado para citometría de flujo: Tampón fosfato salino pH 7.3 (PBS).

Solución de lavado Facs Flow (Becton Dickinson) utilizada para la adquisición de las muestras por citometría de flujo.

Tampón HBSS: 8.5 g de ClNa y 25 mM de Hepes en 1 litro de agua destilada a pH 7.5.

Tampón Macs para selección inmunomagnética: Tampón fosfato salino a pH 7.2, enriquecido con 0.5 % de BSA (Seroalbumina Bovina de Sigma) y 2 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetracético de Sigma).

Solución fijadora: Paraformaldehido (Sigma) diluida al 1 % en PBS.

14.2. Medios de cultivo

Para el mantenimiento de los cultivos se utilizó medio RPMI 1640 que para los diferentes medios se suplementó con:

Glutamina 2 mM (BioWittaker, Bélgica)

Penicilina-streptomina 10000 UI/ml y 10000 µg/ml (BioWittaker, Bélgica)

Aminoácidos no esenciales (Gibco-BRL)

Piruvato sódico (Gibco-BRL)

Anfotericina 10 mg/ml (Fungizona endovenosa)

Geneticina 200 mg/ml (Gibco-BRL)

IL-2 (TECIN™)

IL-7 (RyD System)

Interferon alfa-2b (Intrón-A, Schering Plough)

14.3. Sueros

Suero fetal bovino (BioWittaker, Bélgica)

Suero Humano (BioWittaker, Bélgica)

Los sueros se descomplementaron por calentamiento a 56 °C durante 1 hora y se filtraron posteriormente.

RESULTADOS

1. Diseño de un modelo “*in vitro*” para el estudio de la lisis en células de melanoma CD80+

Para determinar la citotoxicidad mediada por CD28 en la lisis de células de melanoma CD80+ se diseñó un modelo experimental basado en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con la línea NK YT-Indy. En estos estudios se realizaron ensayos de lisis con la línea YT-Indy como célula efectora y la línea celular linfoblastoide transformada con el virus EBV 721.221 como célula diana. La lisis de las células diana se determinó midiendo la liberación de ^{51}Cr al medio de cultivo. La línea celular YT-Indy expresa en su superficie de forma constitutiva la molécula CD28. Por otro lado, la línea 721.221 no expresa HLA clase I, es CD80+ y es lisada de forma eficaz por la línea YT-Indy (Fig. 1).

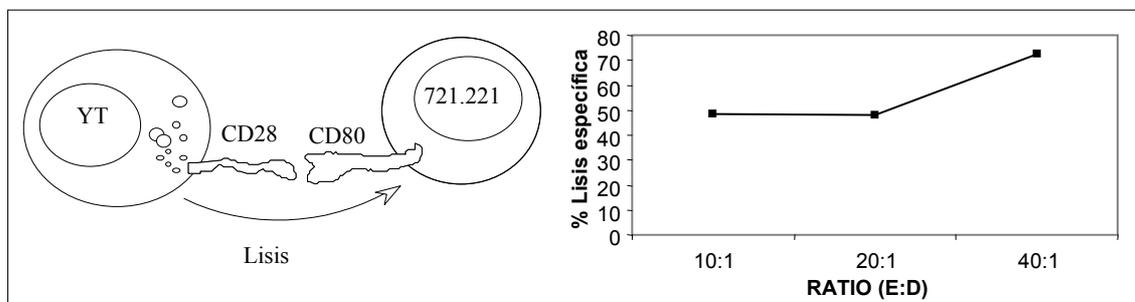


Figura 1. Lisis mediada por CD28 en el modelo YT-Indy. En un ensayo de liberación de ^{51}Cr se determinó la citotoxicidad específica mediada por CD28 y la mejor relación de células efectoras:dianas para inducir dicha lisis. Los datos corresponden a un caso representativo de tres experimentos realizados.

Cuando CD28 interacciona con la molécula CD80 de una célula diana se induce una lisis mediada por Fas (Ca^{++} independiente) y perforina (Ca^{++} dependiente) (Montel et al. 1995). Pues bien, el siguiente paso de este trabajo fue utilizar estas dos líneas transfectadas con diferentes genes para estudiar el efecto de la interacción de receptores inhibidores en la lisis mediada por CD28. La línea celular YT-Indy se transfectó con el gen del receptor inhibidor de la citotoxicidad KIR2DL2 y la línea 721.221 con el gen de HLA-Cw3 que es uno de los ligandos de este inhibidor. Se demostró que bloqueando el receptor inhibidor KIR2DL2 de la célula efectora con el anticuerpo monoclonal gl183 específico para esta molécula, la lisis específica se incrementa significativamente. Por tanto, la interacción entre KIR2DL2 y HLA-Cw3 es capaz de inhibir la lisis mediada por la interacción CD28-CD80 (Tarazona et al. 2002) (Fig. 2).

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar en primer lugar si se produce la lisis de células de melanoma mediada por CD28 con el modelo de la YT-Indy, y en

segundo lugar determinar si dicha lisis se inhibe por la presencia de receptores inhibidores de la citotoxicidad.

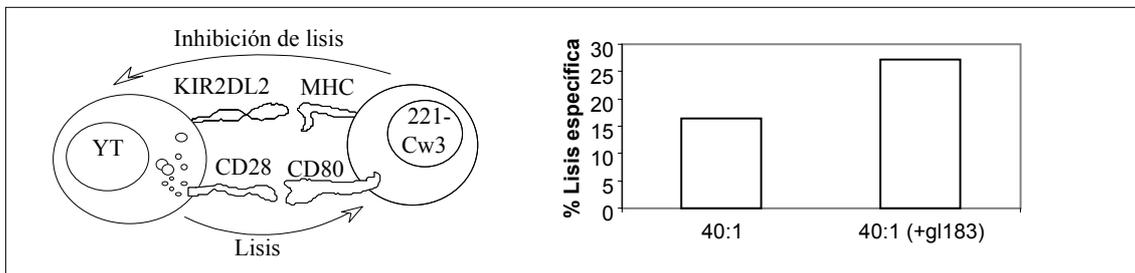


Figura 2. Efecto de la presencia del receptor inhibidor KIR2DL2 en la lisis mediada por CD28 en el modelo YT-Indy. La célula efectora corresponde a la línea YT-Indy-cl43 transfectada con el gen *cl43*, y la célula diana corresponde a la línea 721.221 transfectada con el gen HLA-Cw3. En un ensayo de liberación de ^{51}Cr se determinó la citotoxicidad específica mediada por CD28 y el efecto que sobre ella tiene la presencia de KIR2DL2. Los datos corresponden a un caso representativo de tres experimentos realizados.

Para determinar si la línea YT-Indy tenía la capacidad de lisar células de melanoma se utilizaron como dianas células de melanoma transfectadas con el gen CD80. En los ensayos de lisis se enfrentaron células YT-Indy y células de melanoma CD80+ a diferentes proporciones para conocer la proporción más adecuada. Los resultados mostraron que la proporción 40:1 de efectoras:dianas presentaba la lisis específica más alta (Fig. 3).

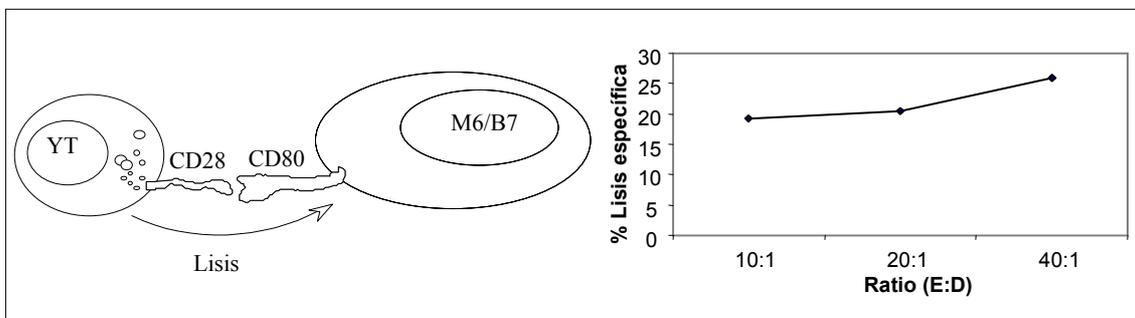


Figura 3. Lisis de células de melanoma CD80+ mediada por CD28 en el modelo YT-Indy. En un ensayo de liberación de ^{51}Cr se determinó la citotoxicidad específica mediada por CD28 sobre la línea de melanoma M6/B7 transfectada con el gen CD80. En la gráfica se representa la relación entre células efectoras y células dianas y sus respectivos valores de lisis específica. Los datos de la gráfica corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados.

Para demostrar que esta lisis era debida exclusivamente a la interacción CD28-CD80, realizamos ensayos de lisis bloqueando la molécula CD28. Los resultados indicaron que cuando se bloquea CD28 la lisis es prácticamente nula. Por tanto, la lisis específica que se observa al enfrentar estas dos líneas es debida únicamente a la

molécula CD28 que activa la lisis de la célula de melanoma a través de su unión con CD80 (Fig.4).

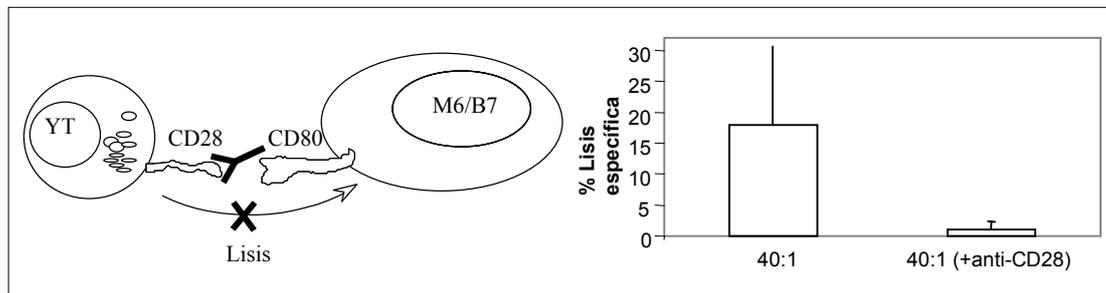


Figura 4. Efecto del bloqueo de CD28 en la lisis mediada por la línea YT-Indy sobre de células de melanoma CD80+. En un ensayo de liberación de ^{51}Cr se determinó la lisis específica mediada por la línea YT-Indy sobre la línea de melanoma M6/B7 transfectada con el gen CD80. Para conocer si la interacción CD28-CD80 inducía la lisis de las células diana, se bloqueó la molécula CD28 con un anticuerpo específico antes de realizar el ensayo. Los datos que se presentan corresponden a la media de cuatro experimentos realizados.

Para determinar el efecto de la presencia de receptores inhibidores en la lisis mediada por moléculas coestimuladoras utilizamos la línea YT-Indy transfectada con el gen KIR2DL2 (YT-Indy-cl43) y la enfrentamos a la línea de melanoma M6/B7 transfectada con el gen CD80 seleccionada por presentar en su superficie la molécula HLA-Cw3 que es uno de los ligandos para KIR2DL2 (Fig.5).

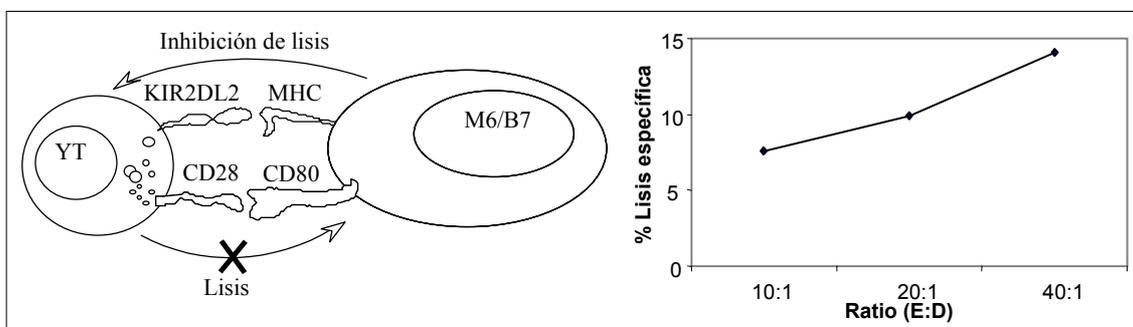


Figura 5. Lisis mediada por la línea YT-Indy-cl43 sobre células de melanoma CD80+. En un ensayo de liberación de ^{51}Cr se determinó la citotoxicidad específica mediada por YT-Indy-cl43 sobre la línea de melanoma M6/B7 transfectada con el gen CD80. En la gráfica se representa la relación entre células efectoras y células dianas y sus respectivos valores de lisis específica. Los datos que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados.

La proporción más adecuada para los ensayos de lisis fue 40:1, con esta proporción se enfrentaron células efectoras YT-Indy-cl43 y células diana de melanoma CD80+. El anticuerpo g1183 se utilizó para bloquear el receptor inhibidor KIR2DL2 (Fig.6). Los resultados mostraron que el bloqueo del receptor inhibidor aumentaba el porcentaje de lisis específica. Con este modelo se demuestra que la unión del receptor

inhibidor KIR2DL2 con su ligando HLA-Cw3 inhibe la lisis de células de melanoma mediada por CD28 - CD80.

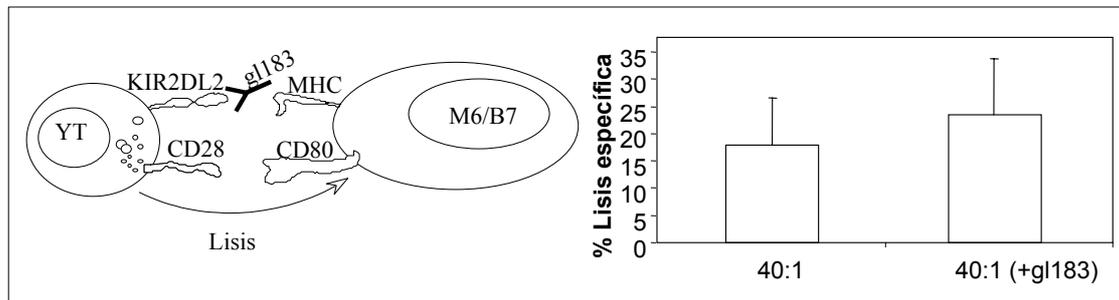


Figura 6. Efecto de la presencia de KIR2DL2 en la lisis mediada por CD28 sobre células de melanoma CD80+. En un ensayo de liberación de ^{51}Cr se determinó la citotoxicidad específica de YT-Indy-cl43 sobre la línea de melanoma M6/B7 transfectada con el gen CD80. Para determinar la inhibición de la lisis, antes del ensayo se preincubó la línea YT-Indy-cl43 con el anticuerpo g1183 para bloquear el receptor inhibidor. Los datos que se representan en la gráfica corresponden a la media de cuatro experimentos realizados.

2. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos T CD8+ de sangre periférica de enfermos de melanoma

La expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos T CD8 se analizó mediante citometría de flujo determinando la expresión de CD27 y CD28 en sangre periférica de enfermos de melanoma e individuos sanos con una media de edad similar. Este análisis se llevó a cabo seleccionando la fracción de células CD8bright, que son aquellas células CD8+ con el canal medio de fluorescencia más alto. Esta fracción de células son además CD3+ por lo que corresponden a la población de linfocitos T citotóxicos. La fracción de células con un canal medio de fluorescencia más bajo se denomina CD8dim, en su mayoría son CD3- y corresponden a la población de células NK.

Se analizó la expresión de CD27 y CD28 en células CD8bright y se comparó la expresión de estas moléculas entre individuos sanos y enfermos de melanoma. Los datos mostraron la existencia de un descenso significativo del porcentaje de moléculas coestimuladoras en células CD8bright en enfermos de melanoma (Fig.7 a y b).

El análisis de la coexpresión de CD27 y CD28 mostró que en los enfermos de melanoma existía un descenso significativo en el porcentaje de células CD8bright CD27+ CD28+. En individuos sanos (n=8) el porcentaje de células CD8bright CD27+ CD28+ fue de $84.5 \pm 14\%$ y en enfermos de melanoma (n=7) fue de $65.3 \pm 20.2\%$.

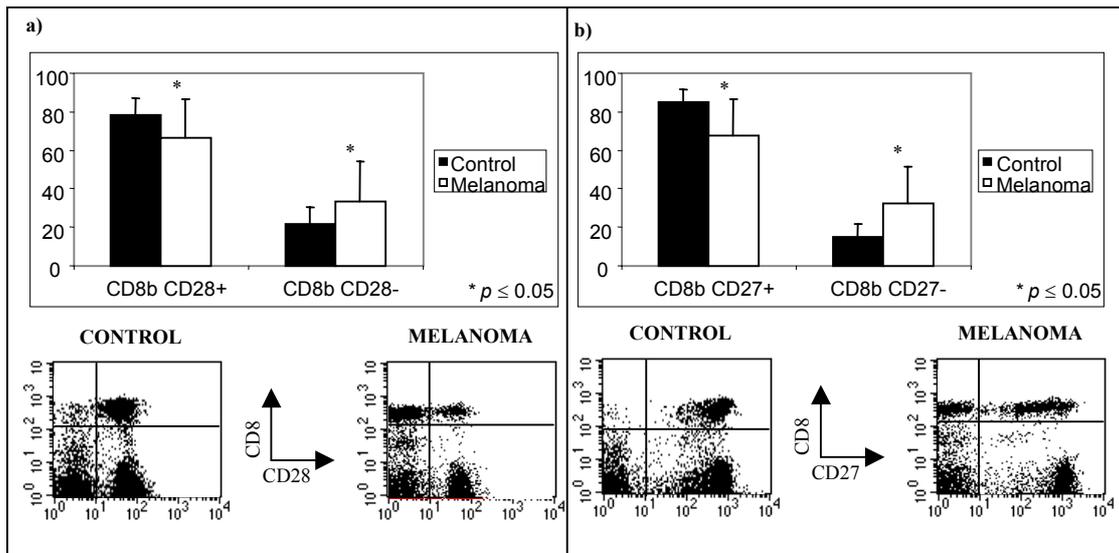


Figura 7. Expresión de CD27 y CD28 en células CD8bright de individuos sanos y en enfermos de melanoma. a) Porcentaje de células CD8bright CD28+/- y la imagen de un diagrama de puntos de un caso representativo. b) Porcentaje de células CD8bright CD27+/- y un diagrama de puntos representativo del análisis. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

La comparación entre controles y enfermos de melanoma se realizó además diferenciando los enfermos de melanoma en dos grupos. Un grupo corresponde a aquellos enfermos en los que se había diagnosticado metástasis, y el otro grupo corresponde a aquellos enfermos que han sufrido un melanoma y no presentaban metástasis en el momento del estudio. La expresión de moléculas coestimuladoras en las células CD8bright de enfermos de melanoma con metástasis fue muy similar a la de los controles sanos, sin embargo, las células CD8bright de enfermos de melanoma sin metástasis presentaron un descenso significativo de estas moléculas con respecto a los individuos sanos. No se observaron diferencias significativas al comparar enfermos con metástasis y sin metástasis (Fig. 8).

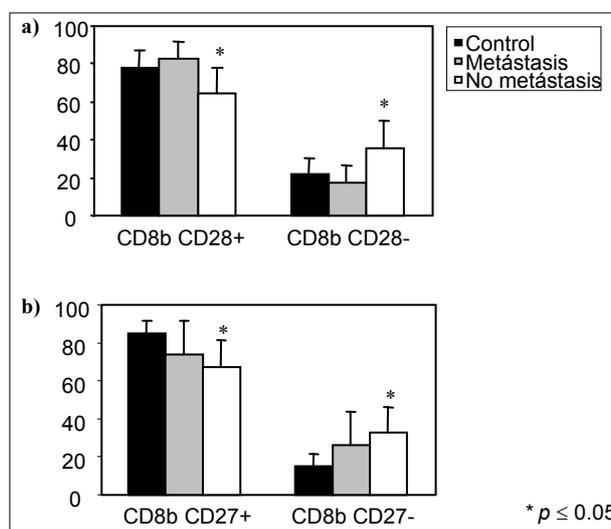


Figura 8. Expresión de moléculas CD27 y CD28 en células CD8bright de individuos sanos y en enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. a) Porcentaje de células CD8bright CD28+/- . b) Porcentaje de células CD8bright CD27+/- . En las gráficas se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Se analizó la expresión de CD27 y CD28 seleccionando la población de células CD8bright. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

En el grupo de enfermos de melanoma que formaron parte de este estudio había un grupo de ellos que estaban recibiendo el tratamiento con Interferón alfa2b. El análisis comparativo entre los dos grupos de enfermos no mostró diferencias significativas, sin embargo, en las células CD8bright de enfermos de melanoma no tratados con Interferón alfa2b se observó un descenso significativo en la expresión de CD27 y CD28 cuando se comparó con los controles sanos. Los datos indican que el tratamiento con Interferón alfa2b en enfermos de melanoma puede prevenir la pérdida de la expresión de moléculas coestimuladoras (Fig. 9).

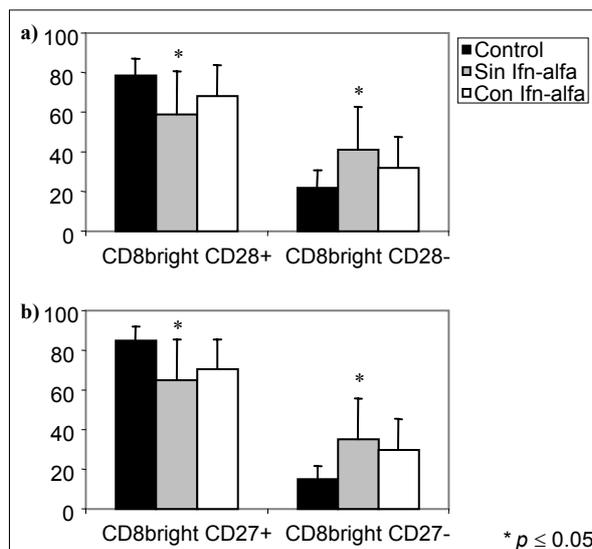


Figura 9. Expresión de moléculas coestimuladoras en células CD8bright de individuos sanos y en enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. a) Porcentaje de células CD8bright CD28+/- b) Porcentaje de células CD8bright CD27+/- Se analizó la expresión de CD27 y CD28 seleccionando la población de células CD8bright. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10). * $p \leq 0.05$

Con estos datos nos planteamos el estudio *in vitro* el efecto del Interferón alfa2b sobre la expresión de CD28 en sangre periférica (Fig.10).

3. Expresión de CD28 en linfocitos T CD8+ de sangre periférica cultivados con interferón alfa2b

Para determinar el efecto del Interferón alfa2b sobre las moléculas coestimuladoras de linfocitos T CD8+, se cultivaron los PBLs de dos individuos sanos en presencia de 10000 U/ml de Interferón alfa2b y se analizó la expresión de CD28 en las células CD8bright a lo largo de dos semanas de cultivo.

En las células cultivadas en presencia de IL-2 e Interferón alfa2b la proliferación celular fue prácticamente nula, mientras que las células cultivadas sólo con IL-2, las células duplicaron su número cada 4-5 días (datos no mostrados).

Los resultados indican que el Interferón alfa2b bloquea el crecimiento celular y mantiene constante la expresión de CD28 en células CD8bright (Fig.10).

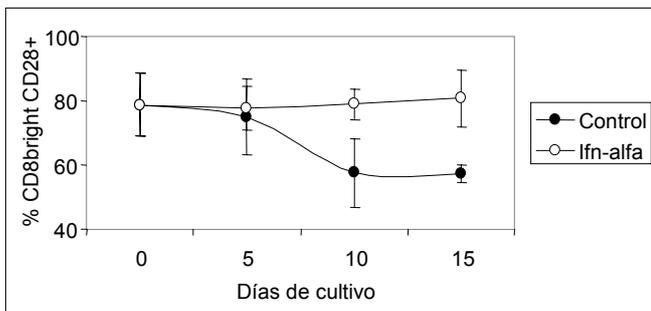


Figura 10. Tratamiento *in vitro* con Interferón alfa2b en PBLs de individuos sanos. Los PBLs control se cultivaron en RPMI completo (+ 50 U/ml IL-2). Los PBLs con Interferón alfa2b se cultivaron en RPMI completo (+ 50 U/ml IL-2 + 10000 U/ml Interferón alfa2b). Las células se incubaron durante 15 días a una concentración de 10^6 células/ml. La gráfica representa el porcentaje de células CD8bright que expresan CD28 en dos cultivos de PBLs independientes.

4. Expresión de receptores asociados a células NK en linfocitos T CD8+ de enfermos de melanoma

Se analizó la expresión de receptores asociados a células NK (NK-Rs) en linfocitos T CD8+ de enfermos de melanoma y controles sanos comparando los porcentajes de expresión de estas moléculas en el total de células CD8bright. Los resultados mostraron que, por lo general, existe un aumento en la expresión de algunos de estos marcadores en las células CD8bright de estos enfermos. En el análisis de la expresión de los receptores CD56, CD57 y CD16 se observó un incremento significativo en el grupo de enfermos de melanoma comparado con los controles sanos. Además, se observó un incremento significativo en la expresión de las moléculas KIR2DL2 o KIR2DS2 reconocidas por el anticuerpo g1183 (Fig.11).

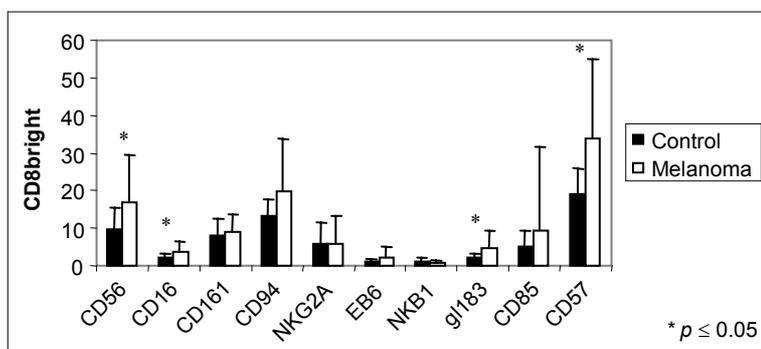


Figura 11. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma. Seleccionando la población de células CD8bright se analizó la expresión de los diferentes NK-Rs. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

* $p \leq 0.05$

Al comparar la expresión de estos receptores en enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis respecto a los controles, se comprobó que las células CD8bright de enfermos de melanoma sin metástasis presentaban un incremento significativo en la expresión de g1183 y CD57. Por otro lado, las células CD8bright de enfermos de melanoma con metástasis presentaron una distribución de NK-Rs muy similar a la que se observa en las células de los controles sanos, no encontrándose diferencias significativas entre estos dos grupos (Fig.12).

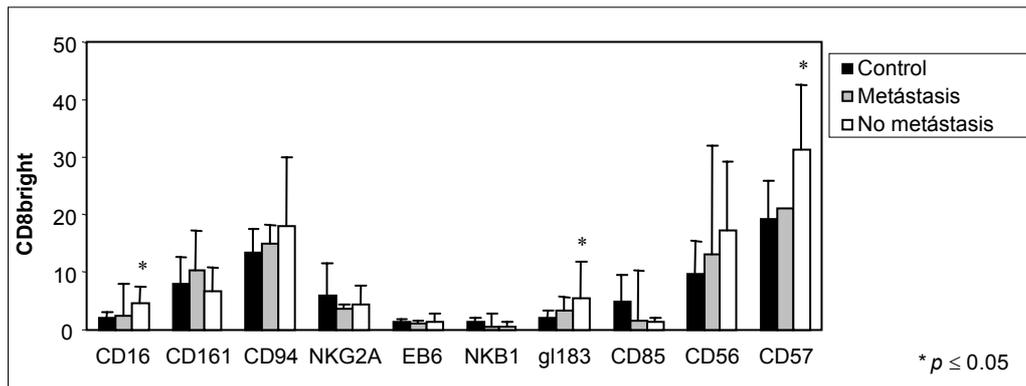


Figura 12. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. Seleccionando la población de células CD8bright se analizó la expresión de los diferentes NK-Rs. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

En el análisis comparativo de la expresión de NK-Rs entre enfermos con metástasis y sin metástasis no se observaron diferencias significativas.

El estudio de la expresión de los NK-Rs en células CD8bright de enfermos de melanoma tratados con Interferón alfa2b mostró un descenso significativo de la expresión de la CD85 en los enfermos tratados con respecto a los controles sanos (Fig.13).

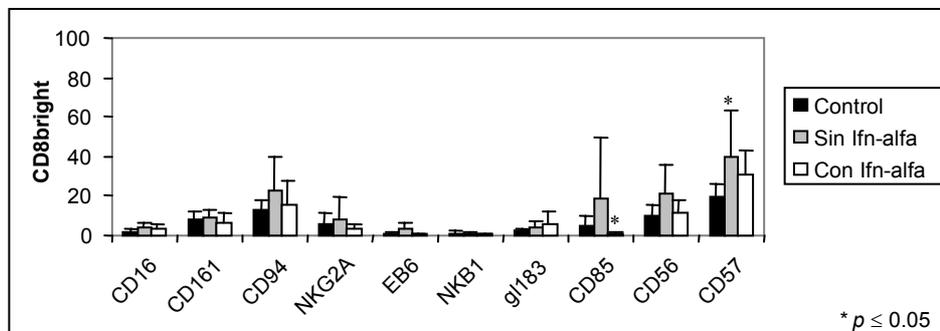


Figura 13. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. Seleccionando la población de células CD8bright se analizó la expresión de los diferentes NK-Rs. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

En el análisis de la expresión de NK-Rs también se estudió la molécula CD94 y su coexpresión con la molécula NKG2A. CD94 es una molécula de superficie que se puede encontrar formando un heterodímero unida a moléculas de la familia NKG2. CD94 unida a NKG2A reconoce a su ligando HLA-E y actúa como un receptor inhibidor de la citotoxicidad. Los resultados mostraron que en enfermos de melanoma la coexpresión de CD94/NKG2A está significativamente disminuida con respecto a la de los controles (Fig.14). Por tanto CD94 podría encontrarse en los linfocitos CD8bright de enfermos de melanoma en forma de homodímero o asociada a otras moléculas de la familia NKG2.

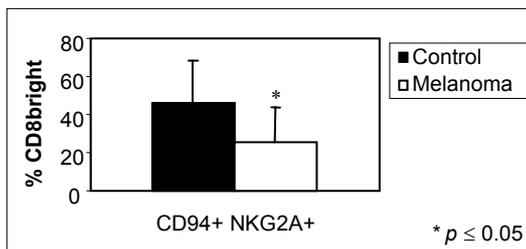


Figura 14. Coexpresión del dímero CD94/NKG2A en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma. El análisis se realizó seleccionando la población de células CD8bright. Dentro de esta población se determinó el porcentaje de células dobles positivas (CD94+ y NKG2A+). Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

Las células CD8bright de enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis también presentaron un descenso en el porcentaje de células que coexpresan CD94 y NKG2A con respecto a los controles. Este descenso fue significativo en los dos grupos (Fig. 15).

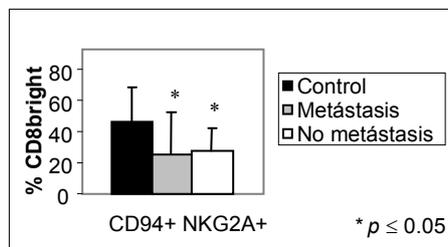


Figura 15. Coexpresión del dímero CD94/NKG2A en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis se realizó seleccionando la población de células CD8bright y determinando el porcentaje de células dobles positivas (CD94+, NKG2A+). En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

Las células CD8bright de enfermos tratados y no tratados con Interferón alfa2b mostraron un porcentaje muy similar en la coexpresión de CD94 y NKG2A, estos porcentajes son significativamente inferiores a los observados en los controles (Fig 16).

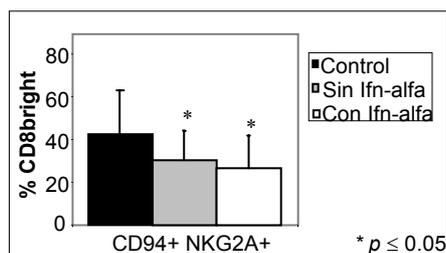


Figura 16. Coexpresión del dímero CD94/NKG2A en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. El análisis se realizó seleccionando la población de células CD8bright y determinando el porcentaje de células dobles positivas (CD94+, NKG2A+). En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

5. Expresión de receptores asociados a células NK en las subpoblaciones CD8bright CD28+ y CD28- de enfermos de melanoma

El análisis de la expresión de NK-Rs también se realizó en función de la expresión de CD28 en las células CD8bright. Este análisis nos permitió definir la distribución de receptores NK en dos subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos: la población de células CD8bright CD28-, cuyo fenotipo está asociado a linfocitos T citotóxicos efectores-memoria, y la subpoblación CD8bright CD28+ que correspondería a los linfocitos T vírgenes o naive (Tarazona et al. 2000). Cuando se comparó la expresión de los NK-Rs entre células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- se observó que existía un predominio en la expresión de estos receptores en la subpoblación de células CD8bright CD28- (Fig.17) tanto en controles sanos como en enfermos de melanoma. El análisis comparativo entre enfermos de melanoma y controles sanos de la expresión de NK-Rs en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- mostró en general un aumento no significativo de estos receptores en la población CD8bright CD28- de enfermos de melanoma (Fig.17). Aunque estas diferencias no fueron significativas, la población CD8bright CD28- de los enfermos de melanoma presentaba una mayor variabilidad en la expresión de estos receptores, y que en algunos enfermos estaban claramente incrementados.

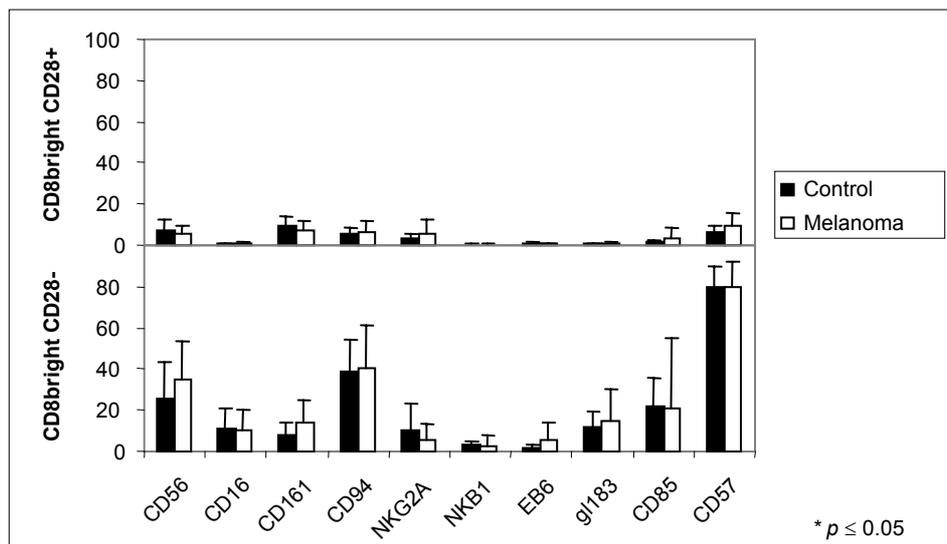


Figura 17. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma. La expresión de NK-Rs se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

La comparación de la expresión de NK-Rs en células CD8bright CD28+ y 28- entre controles sanos y enfermos de melanoma con metástasis, mostró que en estos enfermos hay un descenso significativo de la expresión de NKB1 en la población CD8bright CD28- (Fig.18).

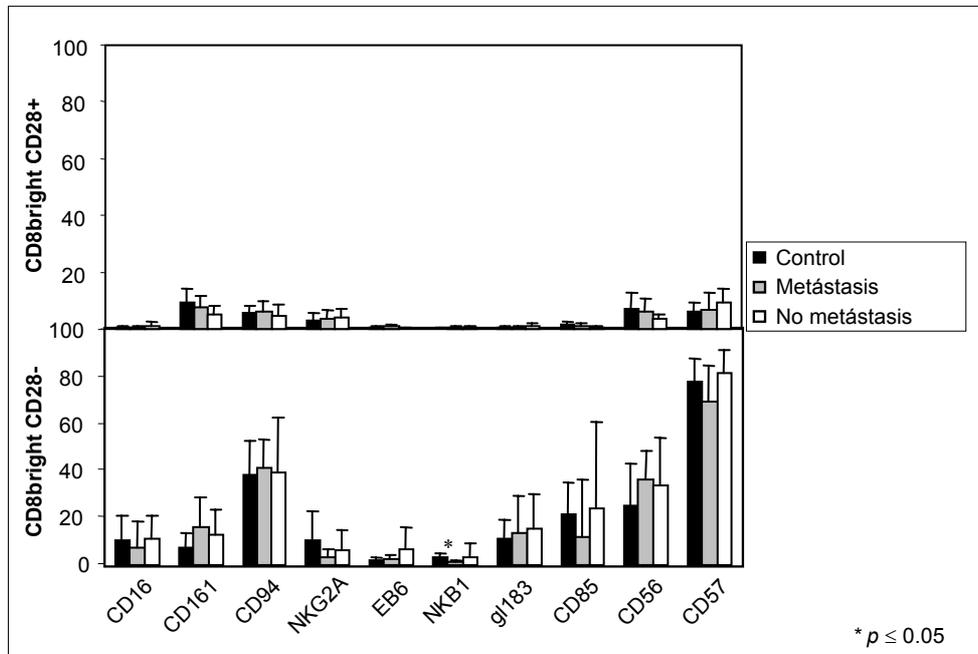


Figura 18. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. La expresión de NK-Rs se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

Por otro lado, al comparar enfermos sin metástasis con controles sanos no se observaron diferencias significativas.

En el estudio de la expresión de NK-Rs en pacientes tratados con Interferón alfa2b, se observó un descenso significativo de CD161 y CD85 en la población CD8+ CD28+ así como un descenso de NKB1 y CD85 en la población CD8+ CD28-. En los individuos no tratados se observó el incremento de CD57 en ambas poblaciones con respecto a los controles sanos (Fig.19).

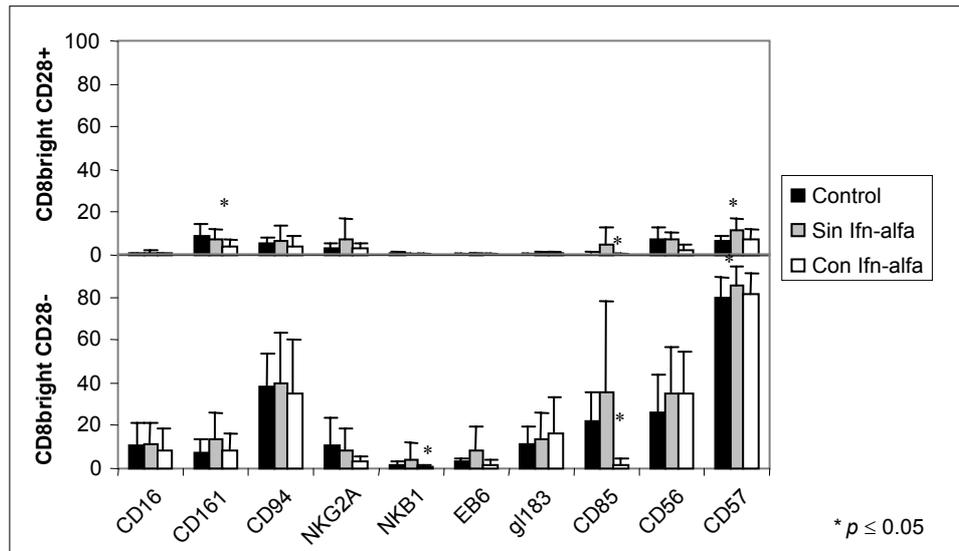


Figura 19. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. La expresión de NK-Rs se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

6. Expresión de receptores asociados a células NK en las subpoblaciones CD8bright CD56+ y CD56- de enfermos de melanoma

El estudio de la expresión de NK-Rs en células CD8bright se realizó además en función del fenotipo CD56 de estas células. La población de células CD8bright CD56+ son consideradas por algunos autores como linfocitos T citotóxicos efectores (Pittet et al. 2000), mientras que las CD8bright CD56- corresponderían a los linfocitos T de fenotipo virgen o naive. Al igual que en las células CD8bright CD28- en la subpoblación CD8bright CD56+ también existe un predominio en la expresión de NK-Rs cuando se compara con las CD8bright CD56- tanto en controles sanos como en enfermos de melanoma (Fig.20).

Al comparar la expresión de los NK-Rs en la subpoblación CD8bright CD56+ de enfermos de melanoma respecto a los controles sanos, se observó un aumento de la expresión de los marcadores CD94, g1183, EB6 y CD57 aunque estas diferencias no fueron significativas. El análisis de la expresión de estos receptores en la subpoblación CD8bright CD56- mostró un aumento significativo en la expresión de CD161 y g1183 en enfermos de melanoma y un aumento no significativo del resto de NK-Rs estudiados (Fig.20).

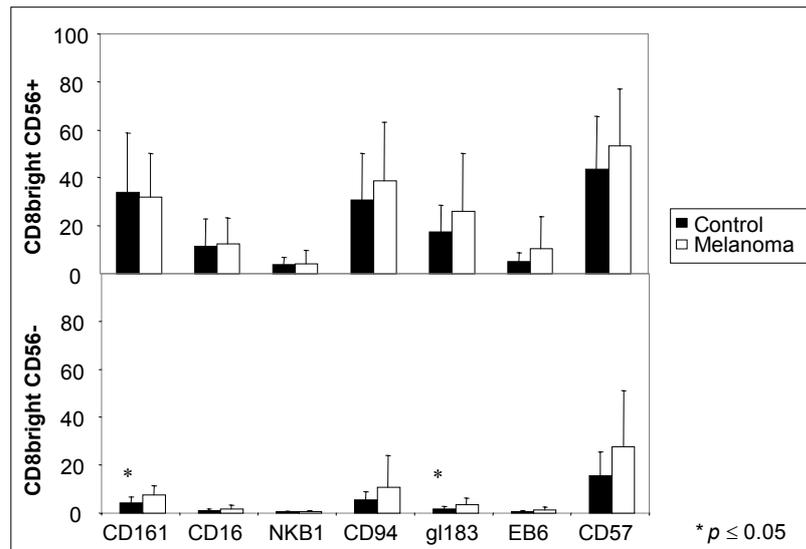


Figura 20. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56- de individuos sanos y enfermos de melanoma. La expresión de NK-Rs se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56-. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

En comparación con los controles, las células CD8bright CD56+ de enfermos de melanoma sin metástasis presentaron incrementos significativos en la expresión de CD57, mientras que la subpoblación CD8bright CD56- presentó incrementos significativos de gl183 y CD57. Sin embargo, las células CD8bright CD56+ y CD56- del grupo de enfermos de melanoma con metástasis no mostraron diferencias significativas en la expresión de NK-Rs cuando se comparó con los controles sanos (Fig.21).

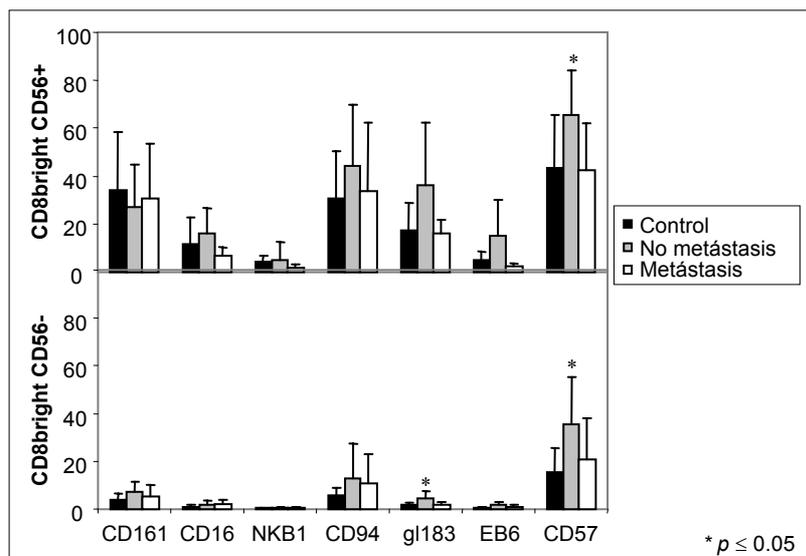


Figura 21. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56- de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. La expresión de NK-Rs se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), y sin metástasis (n=14).

El estudio de los NK-Rs en función del fenotipo CD56 en pacientes no tratados con Interferón alfa2b mostró un incremento significativo de las poblaciones CD8+ CD56- CD161+ y CD8+ CD56- g1183+ con respecto a los controles (Fig. 22).

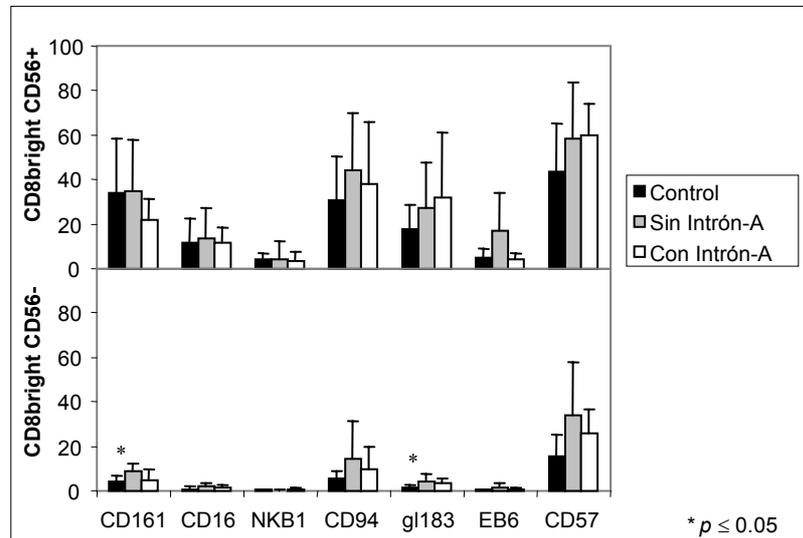


Figura 22. Expresión de receptores asociados a células NK en células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56- de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. La expresión de NK-Rs se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

7. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright de enfermos de melanoma

Para estudiar el grado de diferenciación de las células CD8bright de enfermos de melanoma, se analizó la expresión de las isoformas del marcador CD45 en controles sanos y enfermos de melanoma con y sin metástasis.

Las células CD8bright de enfermos de melanoma presentaron un descenso en la expresión de CD45RA cuando se comparó con individuos sanos, así como un incremento de CD45RO, aunque estas diferencias no fueron significativas (Fig.23).

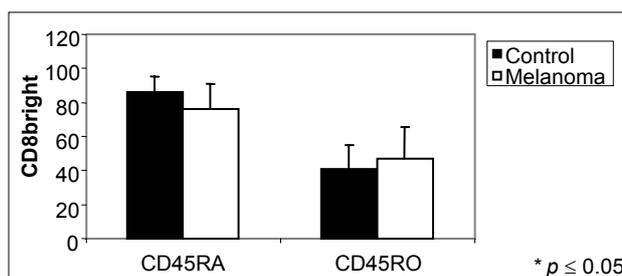


Figura 23. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

Cuando se realizó el análisis de la expresión de las isoformas de CD45 en células CD8bright de pacientes de melanoma con metástasis y sin metástasis observamos que en ambos grupos de pacientes había un descenso de CD45RA y un aumento de CD45RO no significativo cuando se comparaban con los controles sanos (Fig.24).

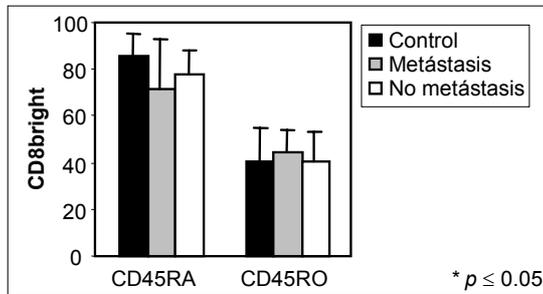


Figura 24. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

Al comparar la expresión de las isoformas de CD45 entre individuos sanos y pacientes tratados con Interferón alfa2b se observó que la expresión de la isoforma CD45RA estaba descendida en este grupo de enfermos, sin embargo, no hubo cambios en la expresión de CD45RO (Fig.25).

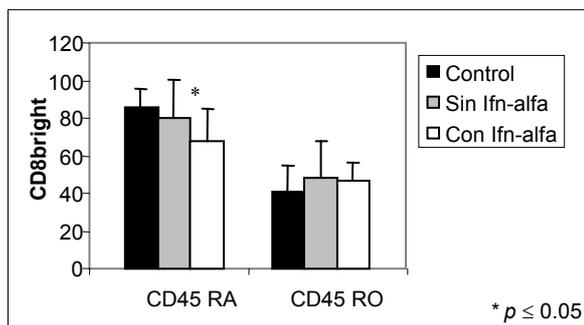


Figura 25. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

8. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD28+ y CD28- de enfermos de melanoma

El análisis de la expresión de los marcadores CD45RA y CD45RO se realizó también en las poblaciones de células CD8bright CD28+ y CD28- (Fig.26).

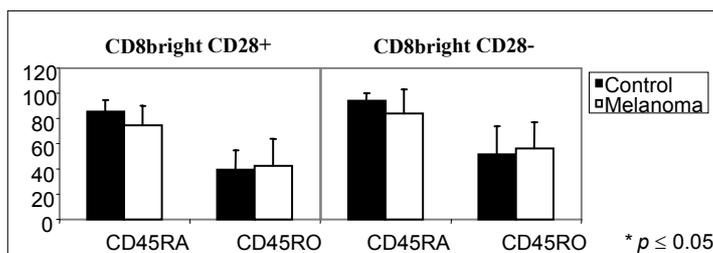


Figura 26. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD28+ y CD8 bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD28-. Individuos sanos (n=9) y enfermos (n=19).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD45RA y CD45RO en las células CD8bright según la expresión de CD28 (Fig.26).

Al comparar la expresión de las isoformas de CD45 en las poblaciones CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de los enfermos de melanoma con y sin metástasis observamos que no existían diferencias significativas en relación con controles sanos, ni entre los dos grupos de enfermos entre sí (Fig.27).

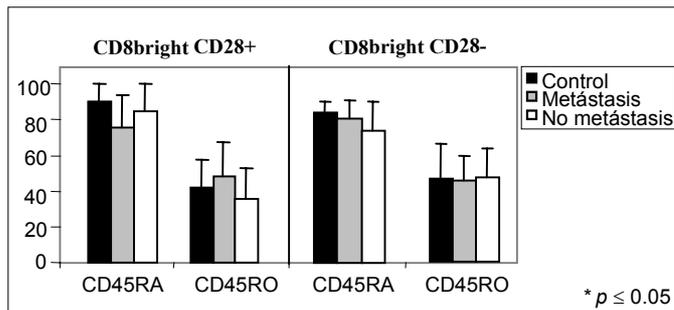


Figura 27. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD28+ y CD8 bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5) y sin metástasis (n=14).

Los enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b no presentaron diferencias significativas respecto a los controles sanos en la expresión de CD45RA y CD45RO, aunque tanto en las células CD8bright CD28+ como en las CD8bright CD28- de los pacientes tratados con Interferón alfa2b la isoforma CD45RA estaba descendida (Fig.28).

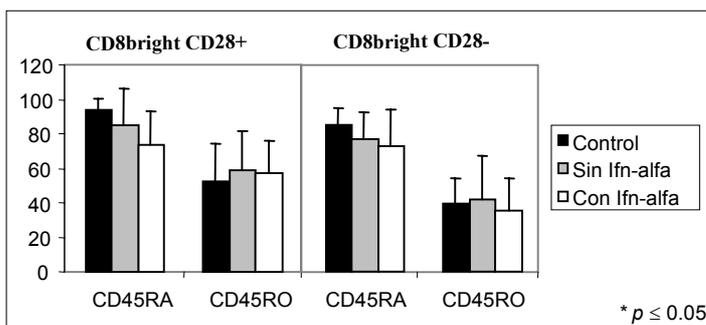


Figura 28. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD28+ y CD8 bright CD28- de individuos sanos y enfermos tratados y no tratados con Interferón alfa2b. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto a los individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y sin tratar (n=10).

9. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD56+ y CD56- de enfermos de melanoma

En las células CD8bright CD56- de enfermos de melanoma se observaron diferencias significativas en la expresión de las isoformas de CD45. En el grupo de enfermos hay un descenso de CD45RA y un aumento significativo de CD45RO cuando se compara con los individuos sanos. Sin embargo en la población CD8bright CD56+

no se contemplaron diferencias significativas en la expresión de estos marcadores (Fig.29).

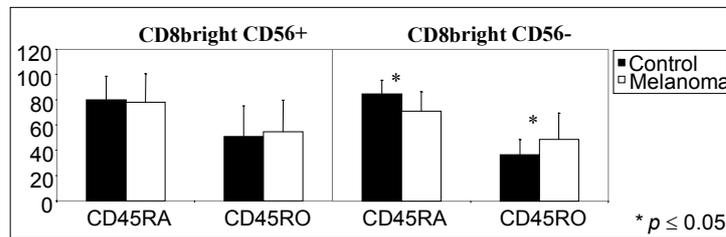


Figura 29. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD56+ y CD8 bright CD56- de individuos sanos y enfermos de melanoma. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD56+ y CD8bright CD56-. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

Cuando estudiamos los enfermos de melanoma según la presencia o no de metástasis y los comparamos con los controles sanos, comprobamos que en la población CD8bright CD56- de enfermos sin metástasis existía un aumento no significativo de la expresión de CD45RO y un descenso significativo en la expresión de CD45RA, además, no se observó ninguna diferencia al comparar los dos grupos de enfermos entre sí (Fig.30).

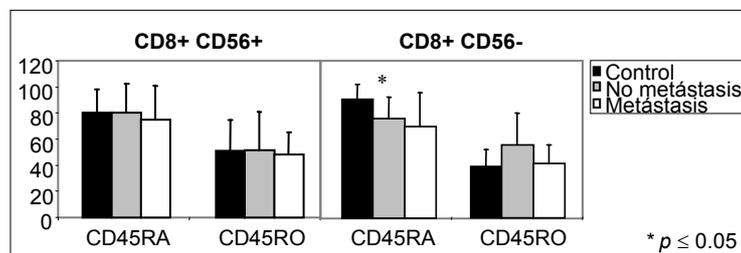


Figura 30. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD56+ y CD8 bright CD56- de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD56+ y CD56-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

En el análisis de la expresión de las isoformas de CD45 en las subpoblaciones CD8bright CD56+ y CD56- en enfermos tratados y sin tratar con Interferón alfa2b, observamos que en la población CD8+ CD56+ de los enfermos tratados con Interferón alfa2b había un ligero descenso de CD45RO que no iba acompañado por un aumento de CD45RA. En la población CD8+ CD56- de los tratados con Interferón alfa2b, sí se observaron diferencias significativas en la expresión de las isoformas de CD45 con un

aumento de CD45RO y un descenso de CD45RA, mientras que entre los dos grupos de enfermos no se vieron diferencias significativas (Fig.31).

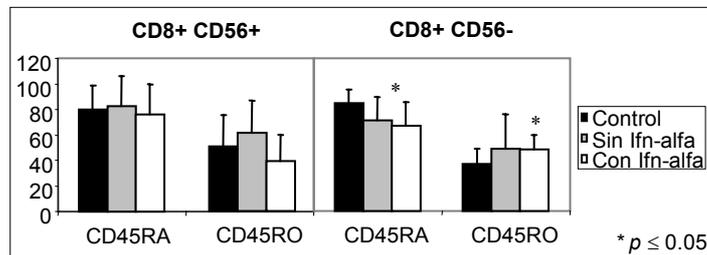


Figura 31. Expresión de marcadores de diferenciación en células CD8bright CD56+ y CD8 bright CD56- de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y sin tratar con Interferón alfa2b. El análisis de la expresión de las isoformas de CD45 se realizó seleccionando la población de células CD8bright CD56+ y CD56-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

10. Expresión de moléculas efectoras en células CD8bright de enfermos de melanoma

Para determinar el grado de activación de los linfocitos T citotóxicos de enfermos de melanoma, analizamos la expresión del marcador de activación CD244 y se determinó el contenido intracelular de perforina en las células CD8bright de estos enfermos.

Observamos que las células CD8bright de enfermos de melanoma presentaban un alto contenido en perforina intracelular así como una elevada expresión de CD244 con respecto a los individuos sanos (Fig.32).

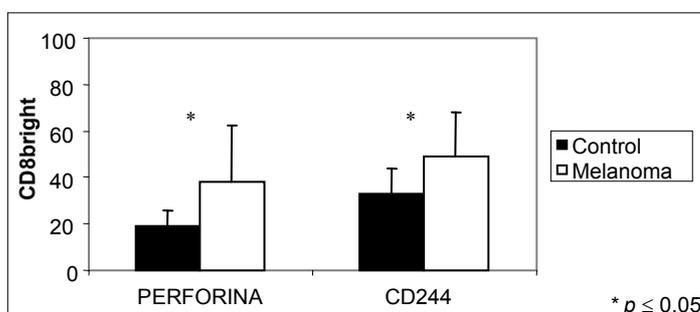


Figura 32. Expresión de marcadores de activación en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma. El análisis de la expresión de la molécula CD244 y las medidas del contenido intracelular de perforina se determinaron seleccionando la población de células CD8bright. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

Cuando se clasifican los enfermos de melanoma en pacientes con metástasis y sin metástasis y se compara la expresión de estos marcadores con la de los controles sanos, comprobamos que en los pacientes con metástasis el contenido intracelular de

perforina está aumentado, no significativamente, con respecto al que existe en las mismas células de los controles. Sin embargo, en los pacientes sin metástasis apenas se observó un aumento con respecto a los controles.

Al analizar la expresión de CD244 se observó un incremento significativo de esta molécula en las células de pacientes sin metástasis con respecto a los controles sanos (Fig.33).

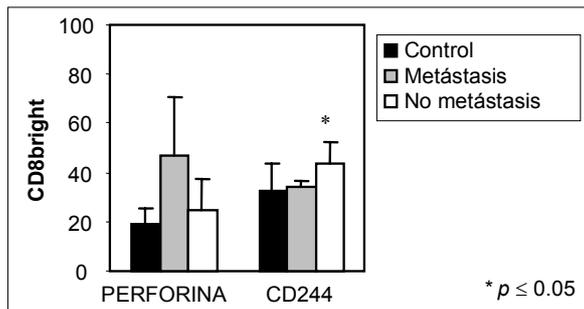


Figura 33. Expresión de marcadores de activación en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis de la expresión de la molécula CD244 y las medidas del contenido intracelular de perforina se determinaron seleccionando la población de células CD8bright. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), enfermos sin metástasis (n=14).

La expresión de moléculas efectoras se estudió también en pacientes de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. Las células CD8bright de pacientes no tratados con Interferón alfa2b presentaron un aumento significativo en la expresión de CD244 respecto a los controles sanos, mientras que los tratados con Interferón alfa2b no presentaron diferencias. Al comparar los dos grupos de enfermos entre sí, no se observaron diferencias significativas (Fig.34).

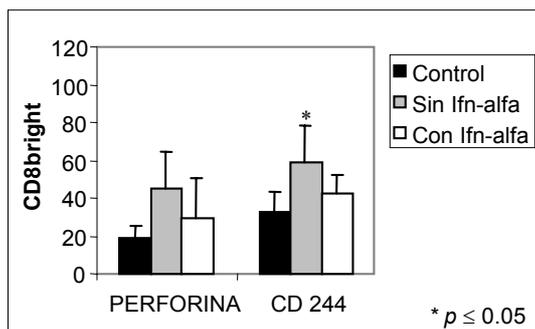


Figura 34. Expresión de marcadores de activación en células CD8bright de individuos sanos y enfermos de melanoma tratados y no tratados con Interferón alfa2b. El análisis de la expresión de la molécula CD244 y las medidas del contenido intracelular de perforina se determinaron seleccionando la población de células CD8bright. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

11. Expresión de moléculas efectoras en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de enfermos de melanoma

Se analizó la expresión de CD244 y el contenido en perforina intracelular en células CD8bright según el fenotipo CD28.

La expresión tanto de CD244 como de perforina predomina en la subpoblación CD8bright CD28-. En los enfermos de melanoma, esta subpoblación CD8bright CD28- presenta un incremento de CD244 y de perforina intracelular respecto a los controles, aunque estas diferencias no son significativas (Fig.35).

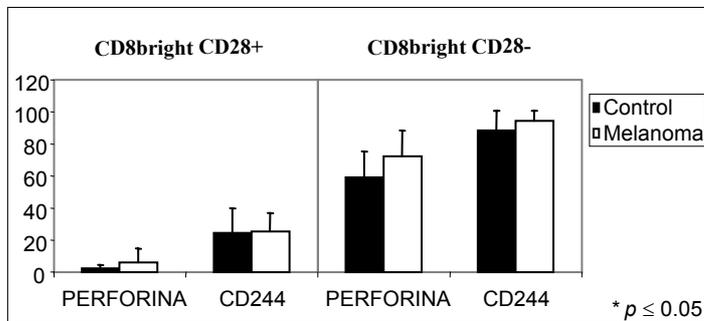


Figura 35. Expresión de marcadores de activación en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma. El análisis de la expresión de la molécula CD244 y las medidas del contenido intracelular de perforina se determinaron seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. Individuos sanos (n=9) y enfermos de melanoma (n=19).

Observamos también un incremento no significativo en el contenido de perforina intracelular en las células CD8bright CD28- de enfermos con metástasis cuando se compararon individuos sanos con enfermos sin metástasis (Fig.36).

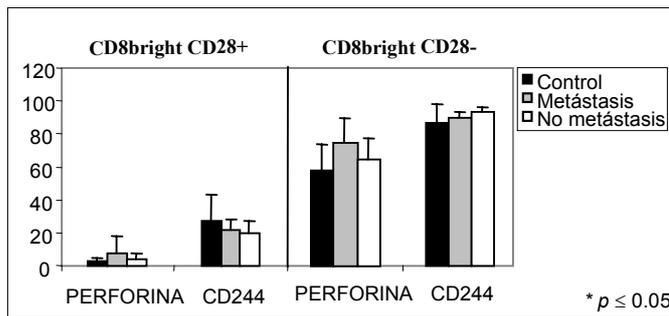


Figura 36. Expresión de marcadores de activación en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis de la expresión de la molécula CD244 y las medidas del contenido intracelular de perforina se determinaron seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto al grupo de individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos con metástasis (n=5), y sin metástasis (n=14).

Los individuos tratados con Interferón alfa2b mostraron un descenso de CD244 en la población de células CD8bright CD28+ y un aumento en el contenido de perforina intracelular en las células CD8bright CD28- con respecto a los controles sanos, aunque estos cambios no fueron significativos. (Fig.37).

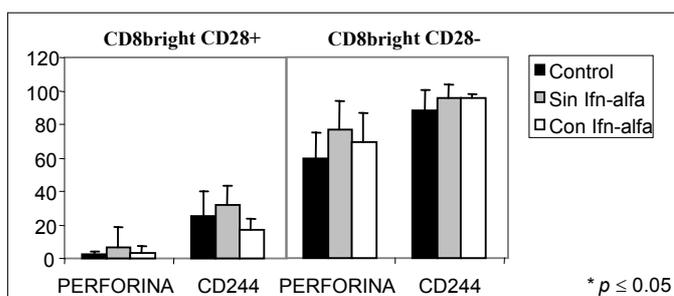


Figura 37. Expresión de marcadores de activación en células CD8bright CD28+ y CD8bright CD28- de individuos sanos y enfermos de melanoma con metástasis y sin metástasis. El análisis de la expresión de la molécula CD244 y las medidas del contenido de perforina se determinaron seleccionando la población de células CD8bright CD28+ y CD28-. En la gráfica se indican las diferencias significativas respecto a los individuos sanos. Individuos sanos (n=9), enfermos tratados con Interferón alfa2b (n=6) y no tratados (n=10).

12. Expansión de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos

Para analizar el fenotipo y características funcionales de linfocitos T CD8+ específicos de Melan-A/MART-1 se seleccionaron individuos sanos HLA-A*0201. Se fraccionaron las células CD8+ para la expansión y la fracción CD8- se utilizó como células estimuladoras de los linfocitos T específicos. Esta fracción CD8- fue incubada con el péptido Melan-A para presentarlo en el contexto del MHC-I. Una vez presentado el péptido, las células fueron irradiadas para realizar dos estimulaciones a 0 y 7 días de cultivo como viene indicado en la sección Materiales y Métodos.

El resultado de la expansión indica que después de 14 días de cultivo en presencia de IL-2 e IL-7, las células CD8+ específicas de Melan-A pasan de un 0.01 % al 5-10 % del total de células CD8+. En la figura 38 se muestra un esquema de dicha expansión y la imagen de citometría de un caso representativo.

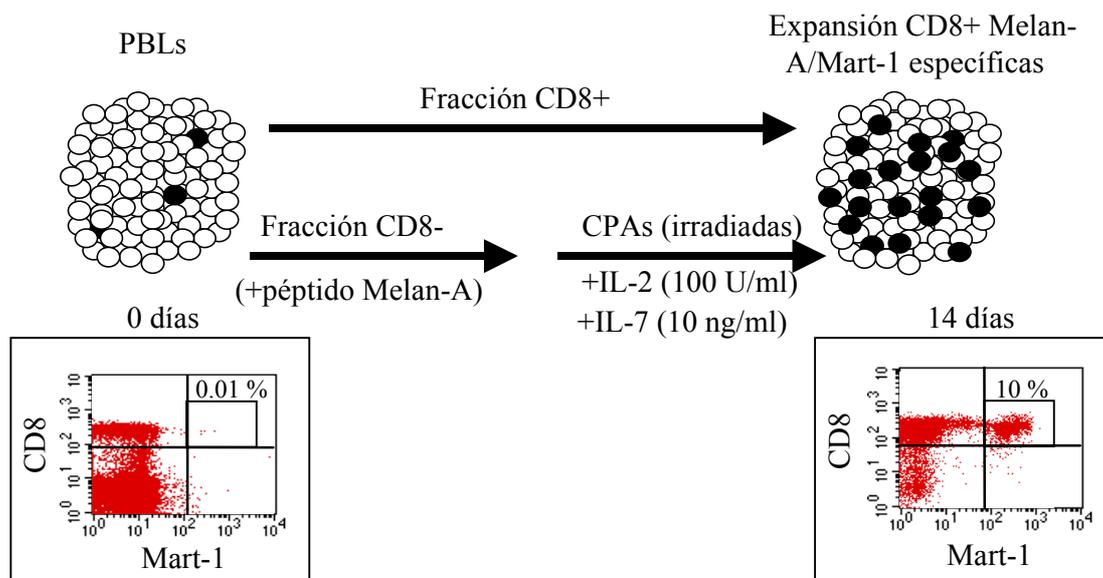


Figura 38. Esquema de la expansión in vitro de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos. Durante 14 días se cultivó la fracción de células CD8+ en presencia de IL-2 e IL-7. La fracción CD8+ se estimuló con la fracción CD8- a los 0 y 7 días. Esta fracción CD8- fue incubada con el péptido Melan-A/MART-1 y posteriormente irradiada a 3000 rad. El resultado de la expansión se determinó mediante el marcaje de células CD8+ con el tetrámero Mart-1. Para las expansiones se seleccionaron 4 individuos HLA-A*0201+ sanos. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

13. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos

Se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 en la población de células CD8+ específicas del antígeno Melan-A/MART-1. El análisis comparativo de la expresión de estas moléculas en linfocitos T CD8+ específicos

obtenidos de sangre periférica y en células cultivadas durante 14 días en presencia de células que presentaban Melan-A/MART-1 no mostró diferencias significativas. Sin embargo, sí existe un descenso significativo de los canales medios de fluorescencia de ambas moléculas en las células en cultivo. La figura 39 muestra un caso representativo de este estudio.

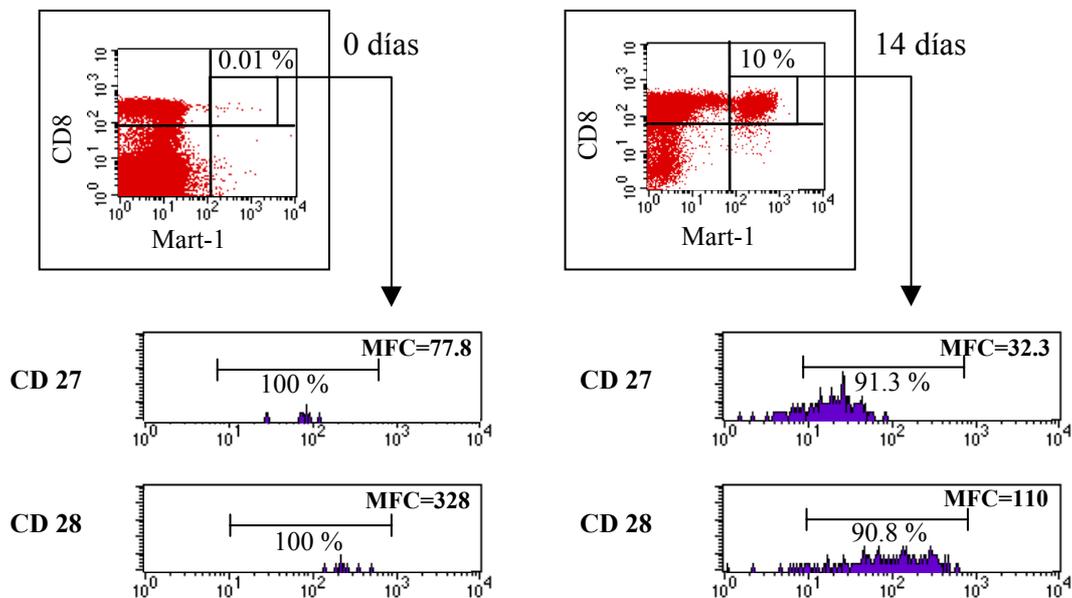


Figura 39. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos. Se analizó la expresión y el canal medio de fluorescencia de CD27 y CD28 en la población de células CD8^{bright} Mart-1⁺ a los 0 y 14 días de cultivo. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

14. Expresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos

Se realizó por un lado el análisis de tres receptores de la familia de los KIRs (fig.40) y por otro, el análisis de CD85 y del dímero CD94/NKG2A (fig.41).

En el análisis de la expresión de los KIRs en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 se observó que existe un descenso en la expresión de los receptores EB6 y gl183 cuando se expanden los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 *in vitro* (fig.40). Al comparar la expresión de estos receptores entre linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 de PBLs y de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 expandidos en cultivo se observó un descenso significativo en el porcentaje de células CD8+ Melan-A/MART-1 EB6+ que pasó del $14 \pm 5 \%$ en PBLs al $1.5 \pm 1.3 \%$ ($p = 0,02$) en linfocitos expandidos *in vitro*. El porcentaje de células CD8+ Melan-A/MART+ gl183+ disminuyó del $10 \pm 10 \%$ hasta el $0.6 \pm 0.2 \%$ ($p = 0,15$).

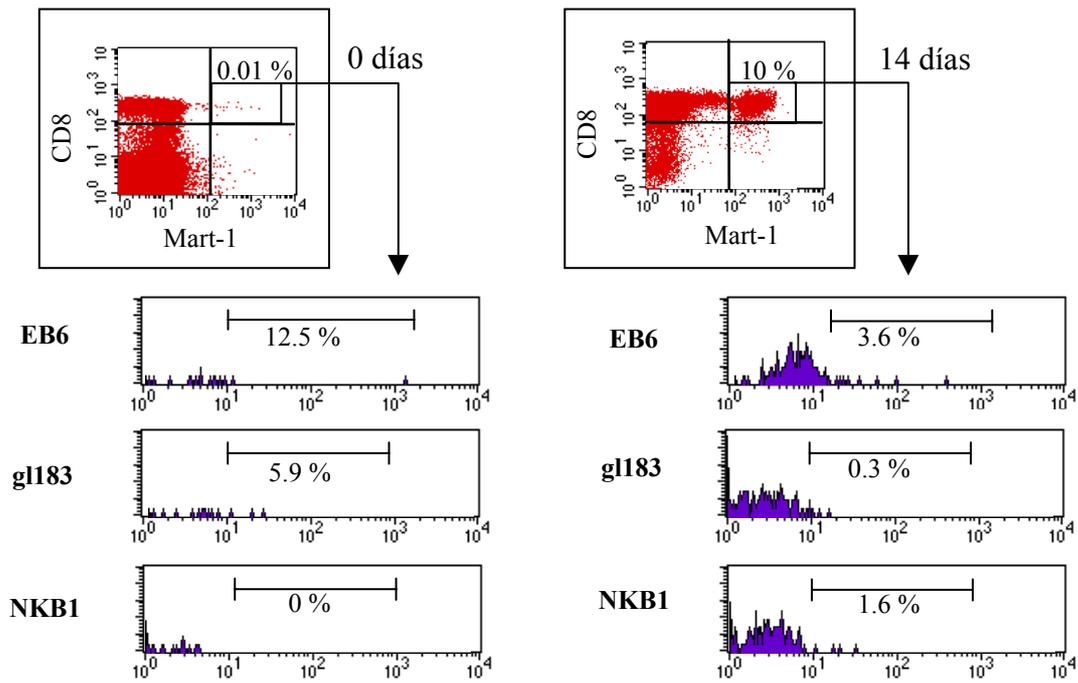


Figura 40. Expresión de KIRs en linfocitos T CD8⁺ Melan-A/MART-1 específicos. Se analizó la expresión de EB6, gl183 y NKB1 en la población de células CD8^{bright} Mart-1⁺ a los 0 y 14 días de cultivo. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

El análisis de la expresión de CD85⁺ en células CD8⁺ Melan-A/MART⁺ mostró que este receptor era el que más se expresaba entre los NK-Rs estudiados. Tras la expansión *in vitro* su expresión disminuyó del 13 ± 8 % hasta 5 ± 6 %, sin embargo este

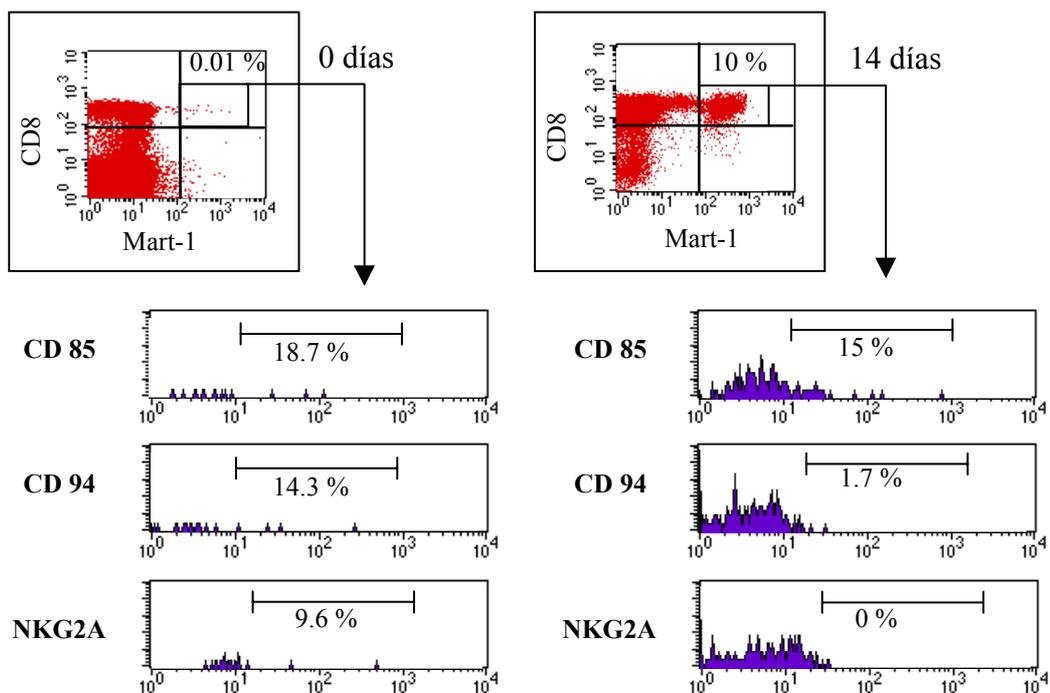


Figura 41. Expresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8⁺ Melan-A/MART-1 específicos. Se analizó la expresión de CD85, CD94 y NKG2A en la población de células CD8^{bright} Mart-1⁺ a los 0 y 14 días de cultivo. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

descenso no se observó en todos los casos como observa la figura 41.

En el caso de CD94 y NKG2A su expresión fue baja en sangre periférica y en condiciones de cultivo, y sólo en algunos casos como el de la figura 41 su expresión disminuyó bruscamente.

15. Expresión de receptores asociados a células NK en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos

Se analizó la expresión de los receptores CD56, CD16 y CD57 en linfocitos T específicos sin estimular y expandidos *in vitro*. Como se observa en el caso representativo (Fig.42), no hay diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 que expresan los receptores CD56, CD16 y CD57 cuando se comparan linfocitos T estimulados y no estimulados *in vitro*.

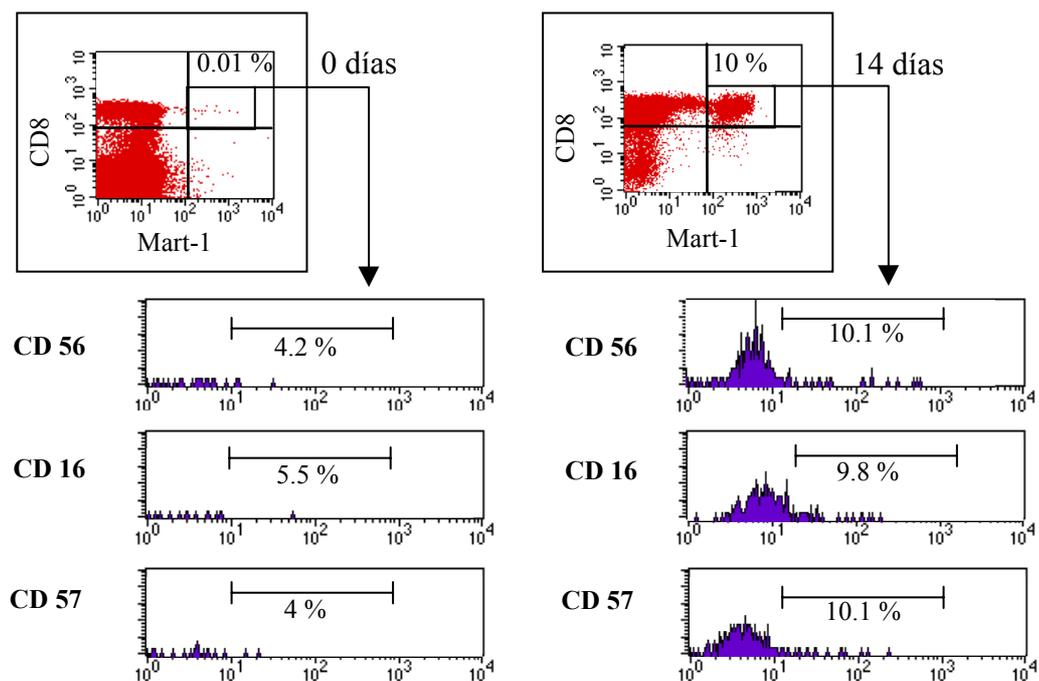


Figura 42. Expresión de receptores asociados a células NK en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos. Se analizó la expresión de CD56, CD16 y CD57 en la población de células CD8^{bright} Mart-1⁺ a los 0 y 14 días de cultivo. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

16. Expresión de marcadores de diferenciación en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos

Para determinar el grado de activación de los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART específicos, se analizó la expresión de las isoformas de CD45, así como la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 (Fig.43).

Los linfocitos T CD8⁺ específicos presentes en sangre periférica de los individuos estudiados, presentan una expresión de CD45RA⁺ y CCR7⁺ del 100 %. En el caso de CD45RO, la expresión de es del 23 ± 6 %.

Cuando estos linfocitos son cultivados y estimulados *in vitro*, la expresión de CD45RA y CCR7 disminuye bruscamente observando que el 19 ± 9 % de los linfocitos T específicos son CD45RA⁺ y el 7 ± 6 % son CCR7⁺. Del mismo modo que disminuye la expresión de CD45RA, la expresión de CD45RO aumenta durante el cultivo hasta alcanzar casi el 100 %.

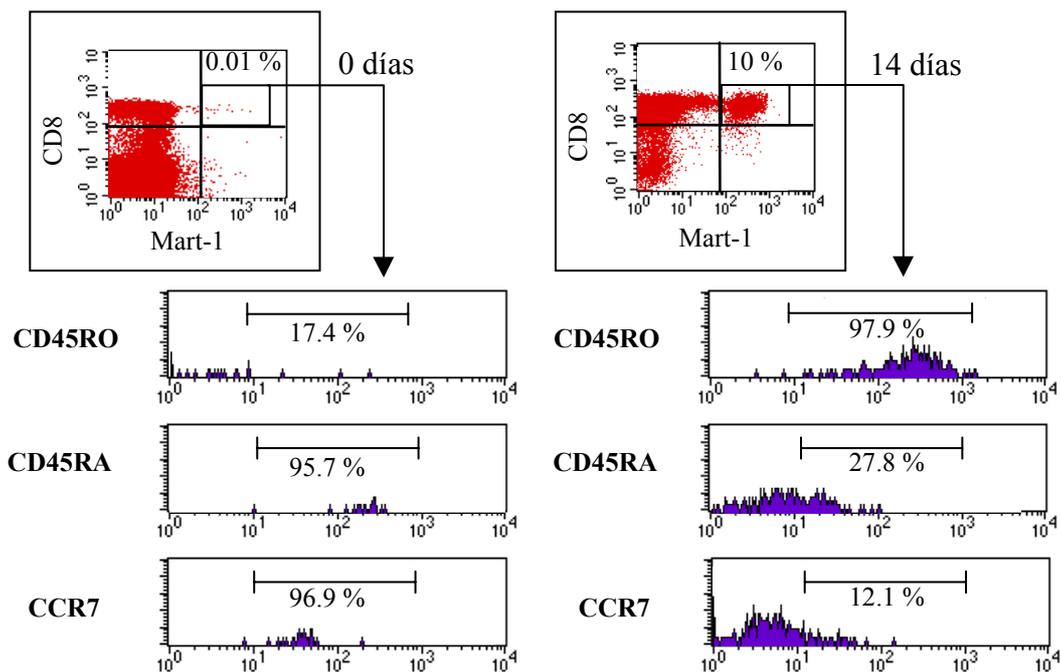


Figura 43. Expresión de marcadores de diferenciación en linfocitos T CD8⁺ Melan-A/MART-1 específicos. Se analizó la expresión de las isoformas de CD45 y la expresión de CCR7 en la población de células CD8^{bright} Mart-1⁺ a los 0 y 14 días de cultivo. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

17. Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8⁺ Melan-A/MART-1 específicos

Se analizó la expresión de los marcadores de activación CD244, FasL y el contenido de perforina intracelular en los linfocitos T específicos en sangre periférica y en cultivo (Fig. 44).

Los linfocitos T específicos de sangre periférica no contienen perforina intracelular y no presentan en su superficie FasL, mientras que la expresión de CD244 es muy variable entre diferentes individuos.

En los linfocitos T específicos cultivados y estimulados *in vitro* no se observa ningún incremento significativo en la expresión de FasL, y el contenido de perforina intracelular es prácticamente nulo. Sin embargo, en las células de todos los individuos estudiados se observa un incremento significativo en la expresión de la molécula CD244 cuando se encuentran en cultivo, pasando de 19.9 ± 19.7 a 49 ± 14.9 .

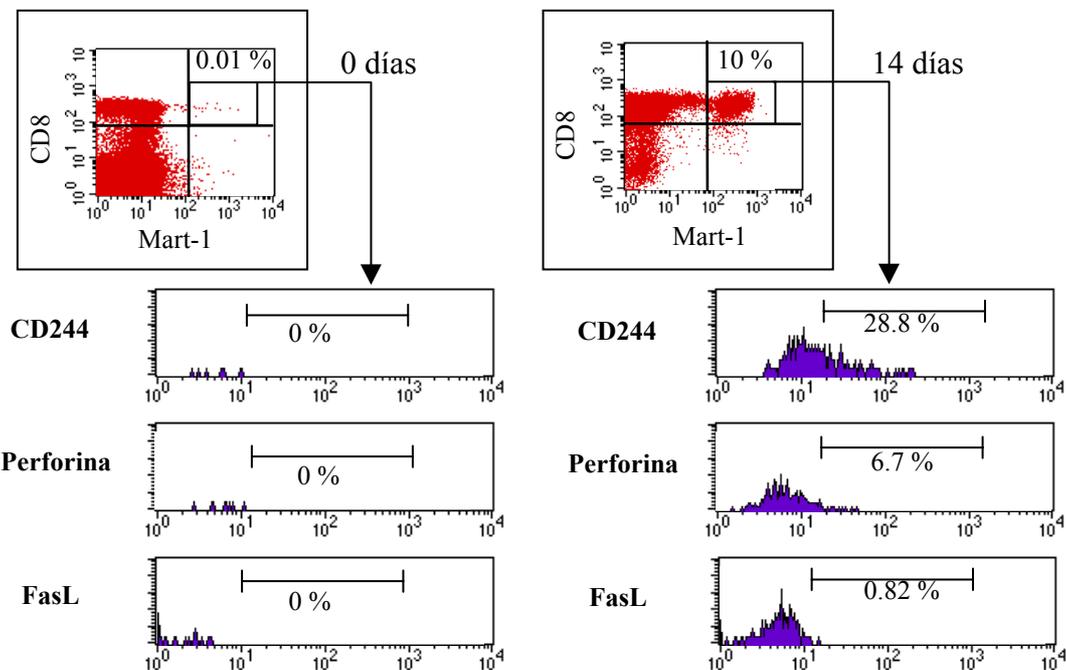


Figura 44. Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos. Se analizó la expresión de CD44 y FasL y se determinó el contenido en perforina intracelular en la población de células CD8^{bright} Mart-1+ a los 0 y 14 días de cultivo. En la imagen de la citometría se muestra un caso representativo de cuatro expansiones.

18. Producción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos expandidos *in vitro*

Mediante la técnica de ELISPOT se evaluó la producción de IFN- γ de los linfocitos T CD8+ específicos del péptido Melan-A/MART-1. En este ensayo se utilizó la fracción de células CD8+ obtenidas de la expansión. La figura 45 muestra un caso representativo en el que el 1.18 % de los linfocitos T CD8+ purificados de la expansión eran específicos del péptido Melan-A/MART-1+. En el caso representativo de la figura 45 se muestran los triplicados con 50000 células. El resultado del recuento de las manchas (spots) indica que después de la expansión, el porcentaje de células productoras de IFN- γ con respecto a la población de linfocitos T CD8 específicos fue de 60.9 ± 16 %. En los PBLs en reposo no se observó la existencia de células productoras

de IFN- γ en respuesta al péptido. Resultados similares se obtuvieron en otros tres ensayos de ELISPOT de diferentes cultivos.

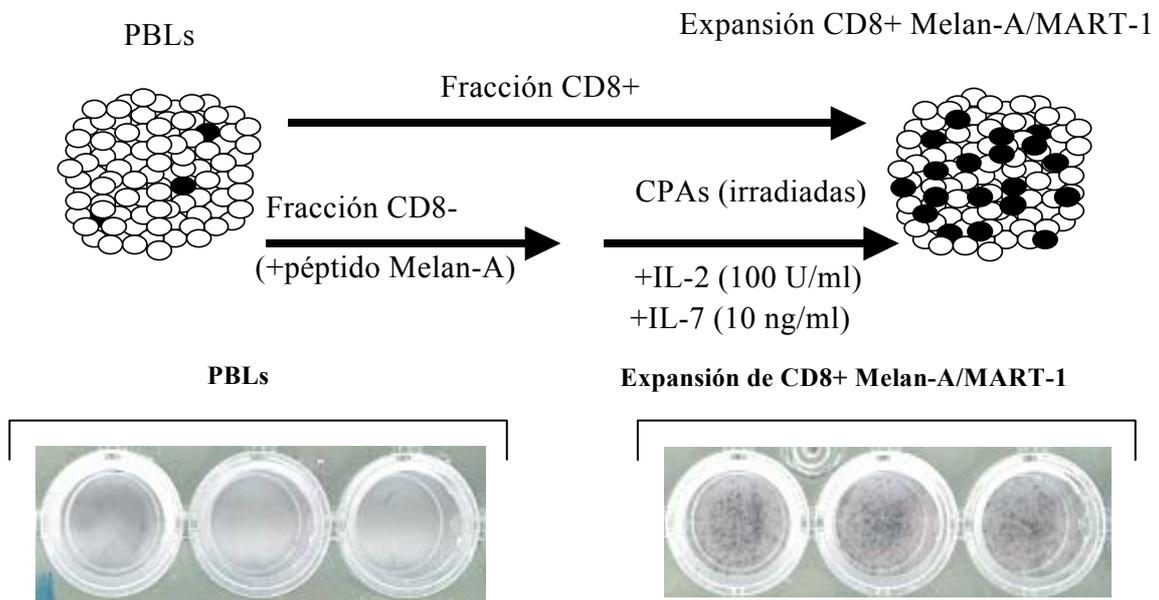


Figura 45. Caso representativo de la medida de IFN- γ en PBLs y en linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 expandidos *in vitro*. Mediante la técnica de ELISPOT se determinó la secreción de IFN- γ en PBLs y en el cultivo de células CD8. En la imagen se muestran los triplicados de 50000 células mononucleares incubadas con el péptido y de 50000 células expandidas *in vitro*. Cada uno de los puntos de los pocillos corresponde a una célula secretora de IFN- γ .

19. Ensayos de lisis mediados por linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos expandidos *in vitro*

Para estos ensayos de lisis, se tomaron las células resultantes de la expansión y se seleccionó la población de células CD8+. Este fraccionamiento se realizó para evitar el efecto de una lisis mediada por células NK presentes en el cultivo. La fracción CD8+ se utilizó como células efectoras en un ensayo donde las células diana eran las células de melanoma M6/B7 transfectadas con CD80, que previamente se habían incubado con el péptido Melan-A/MART-1. El resultado de estos ensayos mostró que los linfocitos T CD8 estimulados *in vitro* tenían capacidad citotóxica frente a la célula diana M6/B7 sin el péptido y que hay un ligero incremento de la citotoxicidad cuando las células diana son incubadas con el péptido (Fig.46).

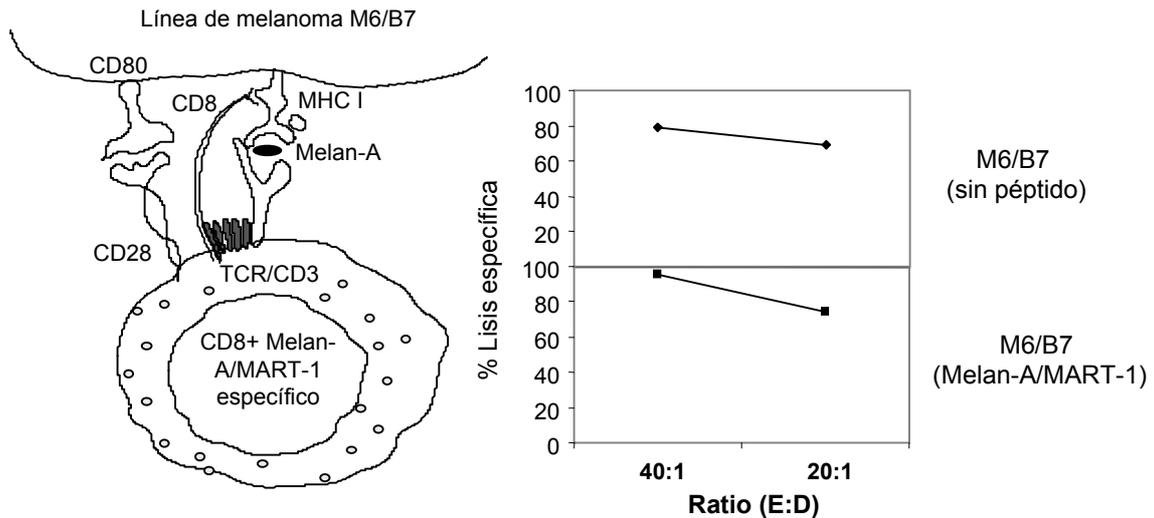


Figura 46. Ensayo de citotoxicidad con linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 expandidos *in vitro* enfrentados a la línea de melanoma M6/B7. En un ensayo de liberación de ⁵¹Cr se utilizaron los linfocitos expandidos *in vitro* como células efectoras y se determinó la lisis específica de la línea de melanoma M6/B7. La línea de melanoma se incubó con el péptido Melan-A/MART-1 para obtener células de melanoma presentadoras. Como control se utilizaron células de melanoma no incubadas del péptido Melan-A/MART-1.

20. Ensayos de CITOSPOT frente a la línea de melanoma M6/B7 con linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos expandidos *in vitro*

En las mismas condiciones que los ensayos de lisis se enfrentaron linfocitos T CD8 específicos con células de melanoma M6/B7 incubadas y no incubadas con el péptido. Se comparó la secreción de IFN- γ de los linfocitos estimulados *in vitro* frente a

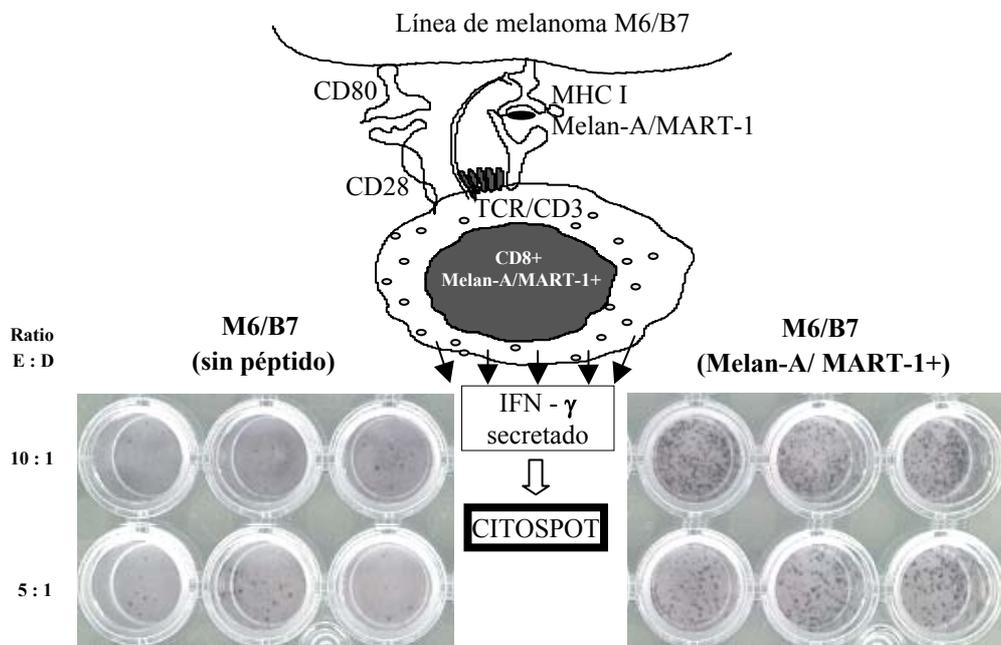


Figura 47. Ensayo de citospot con linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 expandidos *in vitro* enfrentados a la línea de melanoma M6/B7. En una placa de ELISPOT se enfrentaron los linfocitos expandidos *in vitro* con células de la línea de melanoma M6/B7 presentadoras y no presentadoras del péptido Melan-A/MART-1.

células de melanoma presentadoras del péptido reconocido específicamente por los linfocitos T CD8 expandidos.

Se observó que las células de melanoma M6/B7 presentadoras del péptido Melan-A/MART-1 inducen fuertemente la liberación de IFN- γ por las células expandidas en comparación con las células de melanoma que no presentaban dicho péptido (Fig.47).

DISCUSIÓN

La lisis de células de melanoma mediada por CD28 es inhibida por el receptor KIR2DL2

Para estudiar el efecto de la presencia de receptores inhibidores sobre la lisis mediada por CD28 en células de melanoma, se diseñó un modelo *in vitro* en el cual, las células efectoras eran las líneas YT-Indy e YT-Indy-cl43 (transfectada con KIR2DL2) y las células dianas eran la línea celular 721.221 (HLA-I negativa) y 721.221-Cw3+. Los ensayos de lisis realizados con la línea YT-Indy frente a células 721.221 demuestran que la molécula CD28 activa la lisis de células diana a través de la interacción CD28-CD80 como previamente se ha descrito (Montel et al. 1995; Tarazona et al. 2002).

Cuando se realiza un ensayo de citotoxicidad con la línea YT-Indy-cl43 frente a 721.221-Cw3+ se observa que la lisis específica es mayor cuando se bloquea el receptor inhibidor KIR2DL2. De este modo se demuestra que el receptor inhibidor KIR2DL2 a través de su interacción con la molécula HLA-Cw3 inhibe la lisis mediada por la molécula CD28 cuando se utiliza la célula diana 721.221.

Basándonos en estas observaciones preliminares se diseñó un modelo *in vitro* para estudiar la citotoxicidad mediada por CD28 sobre líneas de melanoma. En este modelo se enfrentaron en ensayos de lisis la línea YT-Indy con la línea de melanoma M6/B7 que expresa CD80. La mejor relación de células efectoras:dianas para obtener el máximo de lisis fue 40:1, así se obtuvo una lisis específica cercana al 25 %. El bloqueo de CD28 en la línea YT-Indy anula la lisis específica de células de melanoma con lo que se demuestra que CD28 por sí sólo induce la lisis de células de melanoma CD80+. Se ha descrito que en la citotoxicidad mediada por CD28 estarían implicadas proteínas de transducción de la señal como la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3-K) cuya fosforilación y activación es independiente de lck (Tarazona et al., 2002) y otras como la proteína quinasa C- δ (Teng et al. 1996).

Una vez demostrado en este modelo que la molécula CD28 induce la lisis de células de melanoma CD80 se realizaron ensayos de citotoxicidad con la línea YT-Indy-cl43 frente a la línea de melanoma M6/B7 (CD80+ HLA-Cw3+) para estudiar el efecto que tiene la presencia de receptores inhibidores en esta lisis. Los resultados mostraron que la interacción entre el receptor KIR2DL2 y su ligando HLA-Cw3 inhibe la lisis de células de melanoma inducida por CD28.

Los ensayos funcionales con las líneas YT-Indy han demostrado que la expresión de la molécula CD80 en células de melanoma las hace susceptibles a la lisis mediada por la interacción CD28-CD80, además, la expresión de CD80 en la célula de

melanoma permitiría la coestimulación de los linfocitos T citotóxicos vía CD28, lo que conduce al incremento de la proliferación, la adhesión celular, la activación y la actividad citotóxica del linfocito (Mackensen et al. 1999; Mitchell, 2002).

Los experimentos con la línea YT-Indy-cl43 y las células de melanoma CD80+ HLA-Cw3+ demuestran que la estimulación de CD28 pueden ser inhibida por el receptor inhibitor KIR2DL2 y debería tenerse en cuenta en el diseño de estrategias terapéuticas en las que existe una estimulación antigénica que podría provocar la aparición de receptores inhibidores de la citotoxicidad.

Caracterización fenotípica de linfocitos T CD8 en sangre periférica de enfermos de melanoma

El análisis comparativo de la expresión de moléculas coestimuladoras entre individuos sanos y enfermos de melanoma demostró que en los linfocitos T CD8 existe un descenso significativo en la expresión de CD27 y CD28.

La molécula CD28 está considerada como un biomarcador del envejecimiento y de la activación crónica, la persistencia de clones expandidos *in vivo* con el fenotipo CD8+ CD28- podría ser explicada por la activación, diferenciación y proliferación dirigida por estimulaciones antigénicas sobre la población de células precursoras CD8+ CD28+ (Fagnoni et al. 1996; Trimble et al. 2000). Las células de fenotipo CD8+ CD28- se caracterizan por tener una baja capacidad proliferativa cuando se estimulan *in vitro* y por tener características fenotípicas y funcionales de linfocitos T activados/memoria (Arosa, 2002). Por tanto, el aumento de las poblaciones CD8+ CD28- y CD8+ CD27- (Hamann et al. 1997) en enfermos de melanoma podría ser la consecuencia de una estimulación repetida del sistema inmune que desemboca en un proceso de senescencia replicativa y su acumulación *in vivo* probablemente sea debida a la resistencia a la apoptosis que presenta esta subpoblación (Tarazona et al. 2000). La pérdida de CD28 también se ha observado en otras situaciones de activación crónica del sistema inmune: enfermos infectados por VIH y en el proceso de inmunosenescencia (JG Casado et al. enviado para publicación).

En los enfermos de melanoma estudiados se ha visto que el descenso en la expresión de CD27 y CD28 fue mayor en aquellos pacientes en los que no se había diagnosticado la presencia de metástasis en el momento del estudio y en pacientes no tratados con Interferón alfa2b.

El hecho de que el descenso de CD28 sea mayor en los linfocitos T CD8 de los pacientes sin metástasis que en los linfocitos de pacientes con metástasis podría indicar que la activación del sistema inmune es más adecuada en los pacientes sin metástasis. En los enfermos con metástasis el mantenimiento de CD28 sería el reflejo de un defecto en la activación de la respuesta inmune.

El tratamiento con Interferón alfa2b es eficaz en la respuesta a linfomas y tumores sólidos, y en ensayos *in vitro* se ha visto que además de aumentar la actividad NK y la expresión de moléculas de MHC-I posee una potente actividad antiproliferativa (Eggermont, 2002). El hecho de que se mantenga la población CD8⁺ CD28⁺ de los individuos tratados con Interferón alfa2b en el mismo nivel que los individuos control podría deberse a que el Interferón alfa2b por su actividad antiproliferativa estaría inhibiendo la replicación de los linfocitos T CD8⁺ CD28⁺ que están siendo estimulados en respuesta a una exposición repetida al antígeno, de este modo, el tratamiento con Interferón alfa2b en estos enfermos estaría evitando el paso de los linfocitos T CD8⁺ hacia un proceso de senescencia replicativa.

Para demostrar que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD28⁺ se mantiene constante como consecuencia del tratamiento con Interferón alfa2b, se realizó un ensayo *in vitro* para obtener células estimuladas que han adquirido un fenotipo CD8⁺ CD28⁻ característico de células efectoras/memoria. Para ello, se cultivaron PBLs de individuos sanos durante 15 días en presencia de IL-2, en este tiempo las células T CD8⁺ proliferaron constantemente adquiriendo un fenotipo efector/memoria (CD8⁺ CD28⁻). Cuando se cultivan PBLs en presencia de IL-2 e Interferón alfa2b, la proliferación celular se bloquea casi por completo y el porcentaje de células T CD8⁺ con fenotipo naive CD8⁺ CD28⁺ y CD45RA⁺ CD45RO⁻ (datos no mostrados) se mantiene constante sin que las células entren en un proceso de activación celular.

El análisis de la expresión de receptores asociados a células NK en linfocitos T CD8⁺ mostró que, en general, los enfermos de melanoma tienen incrementada la presencia de algunos de estos receptores, y además, presentan una mayor variabilidad en la expresión de estos receptores.

Concretamente existe un aumento significativo de las poblaciones CD8^{bright} CD56⁺ y CD8^{bright} CD57⁺. El aumento de estas dos poblaciones en los enfermos, podría ser el resultado de una expansión *in vivo* como consecuencia de una estimulación antigénica que ha desembocado en una proliferación extensa (Tarazona et al., 2000).

Según Pittet et al., la expresión de CD56 en células CD8⁺ está directamente relacionada con la función efectora citotóxica del linfocito T (Pittet et al. 2000), de modo que el aumento en el porcentaje de células CD8^{bright} CD56⁺ en PBLs de enfermos de melanoma podría estar relacionado con una mayor actividad citolítica de los linfocitos T CD8⁺ en circulación.

En cuanto al aumento de células CD8^{bright} CD57⁺ está descrito que la expresión de CD57 en células CD8⁺ junto con otras características fenotípicas como CCR7⁻, CD27⁻, CD45RA^{bright}, CD28⁻, CD11a^{bright} indica un fenotipo característico de linfocitos T efectores citotóxicos (Hamann et al., 1997), además se han observado expansiones de células T CD57⁺ CD28⁻ en varias condiciones de activación del sistema inmune (Kern et al. 1996). Por tanto, el aumento de la población CD8^{bright} CD57⁺ en enfermos de melanoma, y particularmente en enfermos de melanoma sin metástasis, podría reflejar un aumento de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 en estos enfermos como consecuencia de la estimulación antigénica a la que están sometidas estas células.

Por otro lado, en estudios funcionales se ha demostrado que el incremento en el número de células CD8⁺ CD57⁺ está estrechamente correlacionado con la producción de IFN- γ en PBLs estimulados vía CD3 (Ohkawa et al. 2001), y aunque en menor medida que las células CD8⁺ CD57⁺, la población CD8⁺ CD56⁺ también produce IFN- γ (Ohkawa et al., 2001). Por tanto, el aumento de estas poblaciones en enfermos de melanoma puede acompañarse de un aumento de la producción de IFN- γ , el cual podría jugar un papel importante en la respuesta Th1 y en la modulación de la expresión de moléculas MHC-I en células de melanoma. Finalmente, en los estudios de actividad citotóxica antitumoral se ha comprobado que la lisis mediada por linfocitos T CD57⁺ es más débil que la mediada por la subpoblación CD56⁺ (Ohkawa et al., 2001).

El estudio de la coexpresión de CD56 y CD57 en células CD8⁺, muestra un incremento significativo de la población CD8⁺ CD56⁺ CD57⁺ en enfermos de melanoma sin metástasis. El aumento de esta población celular con características de células efectoras podría estar correlacionado con una respuesta inmune más adecuada en estos pacientes.

El análisis de la expresión del receptor CD16 (Fc γ RIII) en células CD8 mostró un incremento significativo de este marcador en enfermos de melanoma y más aún en enfermos sin metástasis. En estudios con ratones se ha observado que los mecanismos efectoras dependientes del receptor Fc contribuyen a la acción citotóxica de anticuerpos

específicos de tumor y que un anticuerpo específico antitumoral se uniría preferentemente a receptores Fc activadores como FcγRIII y mínimamente a receptores inhibidores como FcγRIIB (Clynes et al. 2000). Por tanto, una expresión alta del receptor CD16 en células CD8 de enfermos de melanoma puede contribuir a la lisis de células de melanoma por el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En este sentido, se ha descrito la presencia de anticuerpos frente a células de melanoma en pacientes inmunizados con células alogénicas que podrían contribuir a la eficacia terapéutica de la vacunación (Maio et al.).

En los enfermos de melanoma y fundamentalmente en los pacientes sin metástasis se comprobó la existencia de un aumento de la población de células CD8+ gl183+ en relación con los individuos sanos. Este hecho reflejaría la existencia de un mecanismo regulador de la extensión de la función citotóxica de las células CD8 de estos pacientes (Speiser et al. 1999c). Dado que gl183 reconoce tanto la forma activadora (KIR2DS2) como la inhibidora (KIR2DL2) del receptor serán necesarios ensayos funcionales para determinar las implicaciones de dicho incremento.

Finalmente, se ha comprobado que los pacientes de melanoma tratados con Interferón alfa2b tenían un descenso significativo en el porcentaje de células CD8+ CD85+. El ligando de CD85 es la molécula HLA-G que puede estar expresada en la superficie de algunas células tumorales, incluyendo células de melanoma (Paul et al. 1999), de modo que el aumento de células CD8+ CD85+ y la expresión de HLA-G en células de melanoma podría ser indicador de una inhibición de la actividad citotóxica antitumoral en estos pacientes. Por otro lado, el descenso de células CD8+ CD85+ observado en individuos tratados con Interferón alfa2b podría mejorar la citotoxicidad de los linfocitos T CD8 sobre células de melanoma.

En el estudio de la coexpresión del heterodímero CD94/NKG2A en las células CD8+ de enfermos de melanoma, se demostró la existencia de un descenso significativo del porcentaje de moléculas NKG2A unidas a CD94. En ensayos de citotoxicidad con CTLs específicos de antígenos de melanoma, se ha comprobado que la presencia del receptor inhibidor CD94/NKG2A en estos linfocitos bloquea la lisis de células de melanoma (Speiser et al. 1999a). En un estudio con linfocitos T infiltrados de melanoma resultó que el 5 - 10 % de los linfocitos eran CD94+. En esa población de células, la coexpresión del heterodímero CD94/NKG2A se observó en el 50 % de los linfocitos infiltrados de las lesiones primarias y en el 80 % de las lesiones metastásicas

(Vetter et al. 2000), esto podría indicar la existencia de una inhibición de la actividad citotóxica en los linfocitos de estos pacientes.

En modelos animales se ha comprobado un aumento del dímero CD94/NKG2A en células T CD8+ en respuesta al poliovirus, este aumento sería el responsable de la inhibición de la respuesta antiviral observada en estas células (Moser et al. 2002). Además, la expresión del dímero CD94/NKG2A en linfocitos T CD8 puede aumentar en respuesta a citoquinas como TGF- β (Bertone et al. 1999), IL-15 (Mingari et al. 1998), IL-12 (Derre et al. 2002) y en linfocitos T CD4, la expresión de CD94/NKG2A puede inducirse en respuesta a una activación mediada por CD3 y aumenta en presencia de IL-10 y TGF- β 1 (Romero et al. 2001).

Sin embargo nuestros resultados indican que en sangre periférica la coexpresión de CD94/NKG2A en los linfocitos CD8+ de enfermos de melanoma es significativamente inferior a la observada en controles sanos. Estos datos sugieren que en estas células posiblemente exista una asociación de la molécula CD94 con moléculas activadoras de la citotoxicidad como NKG2C o NKG2E. Si esto fuera así, las células CD8 obtenidas de sangre periférica de los enfermos de melanoma presentarían un fenotipo ligado a una actividad citotóxica que aparecería como consecuencia de un proceso de estimulación antigénica donde estarían implicadas citoquinas moduladoras de la expresión de CD94/NKG2A. Resultados similares han sido observados en la infección por VIH (Tarazona et al. 2002).

Las diferencias observadas en la coexpresión de CD94/NKG2A en linfocitos CD8 de sangre periférica y linfocitos infiltrantes de tumor pueden reflejar diferentes estadios de diferenciación/activación celular.

El análisis fenotípico en función del fenotipo CD28 de los receptores asociados a NK nos permitió estudiar la distribución de estos receptores en células cuyo fenotipo se relaciona a células T vírgenes (CD8+ CD28+) y en células que han sido sometidas a un proceso de activación con el fenotipo CD8+ CD28-. Los resultados muestran que tanto en controles sanos como en enfermos, la expresión de receptores asociados a NK es más frecuente en la población de linfocitos T CD8+ CD28- como previamente se ha descrito para las células CD3+ CD28- (Speiser et al. 1999b) (Tarazona et al., 2002). Se ha observado que las células con fenotipo CD8+ CD28- corresponden a células que muestran capacidad citotóxica *ex vivo* (Hamann et al., 1997), por esta razón, la frecuente expresión de receptores NK en la población CD8+ CD28- podría ser el reflejo

de un mecanismo modulador de la extensión de la función efectora del linfocito T CD8 (Speiser et al., 1999b).

En el estudio de la expresión de receptores NK en las subpoblaciones CD8+ CD28+ y CD28- se comparó la expresión de estas moléculas entre individuos sanos y el grupo de enfermos de melanoma diferenciando a su vez los enfermos en función de presentar o no metástasis y en función del tratamiento con Interferón alfa2b. Las comparaciones entre los grupos de enfermos apenas mostraron diferencias significativas, sin embargo, sí que se observó en todos los grupos una mayor variación en el porcentaje de células CD8bright CD28- que expresaban los receptores inhibidores NKB1, EB6, g1183, y CD85. Estas variaciones sugieren que la regulación de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 por receptores NK puede ser diferente en cada paciente.

Como hemos indicado anteriormente, la expresión de CD56 está considerada como un marcador muy útil para identificar linfocitos T CD8+ efectoras en diferentes situaciones clínicas, y se ha demostrado que existe una alta correlación entre la expresión de CD56 y la capacidad citotóxica del linfocito T (Pittet et al., 2000).

En este trabajo se analizó la expresión de receptores asociados a células NK en las poblaciones CD8+ CD56+ y CD8+ CD56- de enfermos de melanoma para determinar si la presencia de estos receptores pudiera estar influyendo en la capacidad de lisis de las células CD8+ efectoras.

El análisis de los resultados indica que la expresión de receptores NK es muy abundante en células con fenotipo CD8+ CD56+, mientras que en aquellas con fenotipo CD8+ CD56- su expresión es prácticamente nula tanto en individuos sanos como en enfermos de melanoma. El aumento de la expresión de estos receptores en la población CD8+ CD56+ podría indicar la existencia de una modulación de la actividad lítica de los linfocitos T citotóxicos efectoras.

Al comparar la expresión de los receptores NK en células CD8+ CD56+ de individuos sanos con el grupo de enfermos de melanoma, prácticamente no se observaron diferencias significativas, sin embargo, sí que existe una tendencia al aumento de la expresión de CD94, g1183, EB6 y CD57 en los enfermos, fundamentalmente en aquellos pacientes que no presentan metástasis. Estos resultados podrían indicar que, aunque los enfermos presentan un alto número de linfocitos T

citotóxicos con un fenotipo efector (CD8⁺ CD56⁺), la capacidad citotóxica podría estar regulada por receptores NK.

La molécula CD45 juega un importante papel en las funciones del linfocito T y en su activación vía TCR. La expresión de las diferentes isoformas de CD45 en una célula depende de su estado de maduración y de si ha sido o no expuesta previamente a algún antígeno (Altin and Sloan, 1997).

Por tanto, las isoformas de CD45 cambian durante la diferenciación celular, la molécula CD45RA está expresado en linfocitos T vírgenes o naive, mientras que los linfocitos que expresan CD45RO representan a una población de linfocitos T memoria que han entrado en contacto con el antígeno (Young et al. 1997). En este trabajo se estudió la expresión de CD45RA y CD45RO en linfocitos T CD8⁺ de enfermos de melanoma y se analizó además su expresión en función del fenotipo CD28 y CD56.

Aunque el análisis de las isoformas de CD45 en células CD8⁺ no mostró diferencias significativas respecto a los controles sanos, se pudo observar en el grupo de enfermos, una tendencia al aumento y a la disminución de las poblaciones CD8⁺ CD45RO⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺ respectivamente. Este hecho sugiere que en los enfermos de melanoma está sucediendo un proceso de estimulación antigénica que pone en marcha la diferenciación de los linfocitos T, induciendo el cambio de CD45RA a la isoforma CD45RO. En los enfermos con metástasis y en los tratados con Interferón alfa2b, esta tendencia fue aún mayor.

Según Monsurro et al. el análisis de CD27/CD45RA es un buen indicador de las fases de activación celular. El descenso en la expresión de CD45RA junto con el descenso CD27 previamente observado en los enfermos de melanoma indica el predominio de células con fenotipo efector/memoria en estos pacientes (Monsurro et al. 2002).

En las células CD8⁺ de enfermos de melanoma se determinó la presencia de moléculas responsables de la actividad citolítica del linfocito T midiendo el contenido en perforina intracelular y la expresión de la molécula de superficie CD244. La perforina es una proteína que forma poros en la membrana de las células diana, es homóloga a la proteína C9 del complemento y es secretada por células NK y linfocitos

T activados, mientras que el receptor CD244 se expresa en la superficie de células NK y en una subpoblación de linfocitos T CD8+ e induce la lisis en células diana CD48+.

Nuestros resultados mostraron un incremento significativo en la expresión de CD244 en los enfermos de melanoma, fundamentalmente en pacientes sin metástasis y sin tratamiento con Interferón alfa2b. Se ha descrito que el aumento de CD244 se correlaciona con la adquisición de características de células efectoras (Speiser et al.). Por otro lado, se ha observado que la respuesta proliferativa de linfocitos T citotóxicos puede ser incrementada por la interacción CD244-CD48 y que las interacciones CD244-CD48 pueden ocurrir entre células T (Kambayashi et al. 2002). Por esta razón, el aumento de células CD8+ CD244+ en enfermos de melanoma sería el indicador de una mayor respuesta inmunológica.

Las medidas de perforina intracelular en células CD8 de enfermos de melanoma mostraron que en estos pacientes existe un aumento significativo de esta molécula con respecto a las medidas en los controles. El aumento en el contenido de gránulos de perforina intracelular en linfocitos T CD8+ de enfermos de melanoma está asociado al proceso de activación y diferenciación celular que se ha descrito en estos pacientes. En este proceso de activación, existe fundamentalmente un estímulo antigénico y un entorno de citoquinas favorable para el cambio fenotípico de linfocito T virgen a linfocito T efector que implica la adquisición de la maquinaria necesaria para realizar la lisis. En el entorno de citoquinas favorable para la activación del linfocito T las citoquinas IL-2 e IL-15 juegan un papel fundamental y actualmente están siendo ensayadas para la inmunoterapia en algunos enfermos de cáncer (Fehniger et al. 2002). La IL-2 y la IL-15 son dos factores de crecimiento que regulan la función del linfocito T y la homeostasis. En pacientes tratados con rIL-2 se ha observado un incremento en la expresión del gen de la perforina en relación con los mismos pacientes no tratados (Leger-Ravet et al. 1994) y en experimentos *in vitro* con PBLs de enfermos de melanoma tratados con IL-15 se ha obtenido una activación de la citotoxicidad celular frente células de melanoma autólogas (Gamero et al. 1995).

Por tanto, los datos obtenidos donde se muestra que los linfocitos T presentan un aumento de CD244 y perforina que podría ser la consecuencia de un proceso de activación celular en la que fundamentalmente interviene IL-2 y una inducción de los mecanismos efectoras de la que en parte es responsable la IL-15. Los datos que indican

una alta concentración de IL-2 e IL-15 en el suero de alguno de estos pacientes (Lauerova et al. 2002) así lo corroboran.

Se ha observado que los pacientes con metástasis y aquellos que no estaban recibiendo tratamiento con Interferón alfa2b presentaban una alta expresión de perforina. La razón de este aumento en los enfermos con metástasis podría deberse a que en estos pacientes existe una mayor estimulación antigénica que trae consigo la aparición del fenotipo efector/memoria como ya habíamos observado previamente en la expresión de moléculas coestimuladoras y CD45. En el caso de los pacientes tratados con Interferón alfa2b, la baja expresión de perforina podría deberse a que el interferón-alfa2b está inhibiendo la proliferación celular.

El análisis de las moléculas efectoras de la citotoxicidad en función de la expresión de CD28 en los linfocitos T CD8+ se realizó para estudiar las moléculas efectoras de la citotoxicidad celular en linfocitos T citotóxicos de fenotipo virgen (CD8+ CD28+) y en linfocitos con fenotipo efector/memoria (CD8+ CD28-) de enfermos de melanoma.

Los datos mostraron que en enfermos de melanoma al igual que en individuos sanos, estas moléculas efectoras se expresan mayoritariamente en células de fenotipo CD8+ CD28-; además, en los enfermos de melanoma hay un aumento (no significativo) del contenido de perforina intracelular en esta subpoblación. Por tanto, en los enfermos de melanoma hay un predominio de linfocitos con el fenotipo activado CD8+ CD28- CD45RA- CD45RO+ y presentan mayoritariamente las moléculas efectoras perforina y CD244.

En los enfermos con metástasis se observó que la expresión de perforina intracelular en células CD8+ CD28- es mayor que en controles y en enfermos sin metástasis. Esto podría indicar que en estos pacientes existe una mayor estimulación antigénica de los PBLs acompañada de un patrón de citoquinas que aumenta la activación. Los trabajos en los que se realizaron medidas de citoquinas en enfermos con metástasis han demostrado que en estos pacientes existen altas concentraciones de IL-12 (Lauerova et al., 2002), además, el hecho de que algunas células de melanoma produzcan IL-15 (Barzegar et al. 1998) podría favorecer la activación de los linfocitos T citotóxicos.

Sin embargo, en los sueros de pacientes con metástasis también existen altas concentraciones de las citoquinas IL-6 (Moretti et al. 2001), IL-10 (Sato et al. 1996) y bajos niveles de IFN- γ que podrían estar permitiendo a las células de melanoma un escape a la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

Caracterización fenotípica y funcional de linfocitos T específicos de antígenos de melanoma

El antígeno Melan-A/MART-1 está expresado en la mayoría de los melanomas y en un 60 % de las líneas de celulares (Castelli et al. 2000). Se han identificado linfocitos T citotóxicos que reconocen este antígeno en infiltrados de tumor y en la sangre periférica de individuos sanos y enfermos de melanoma (Dunbar et al. 2000). Ya que no todos los individuos sanos HLA-A2 presentan linfocitos T CD8 Melan-A/MART-1 específicos, seleccionamos mediante el estudio fenotípico con tetrámeros aquellos individuos sanos HLA-A2 con linfocitos T CD8 Melan-A/MART-1 específicos y se utilizaron sus PBLs para realizar una expansión *in vitro*. La fracción CD8- de los PBLs se utilizó como células presentadoras del antígeno Melan-A/MART-1 para estimular el crecimiento de la población de linfocitos T específicos. Los resultados demuestran que con este protocolo de expansión se puede obtener un número alto de linfocitos T específicos que permite realizar ensayos funcionales. Además, la expansión de estos linfocitos T con el péptido Melan-A/MART-1 nos ha permitido estudiar *in vitro* los cambios fenotípicos y funcionales tras el reconocimiento antigénico. Por otro lado, además, este tipo de protocolos de expansión *in vitro* podría ser utilizado en inmunoterapia para reinyectar las células T expandidas que tengan la capacidad de reconocer y lisar específicamente una célula (Oelke et al. 2000).

Con la técnica del tetrámero se realizó el marcaje de los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos en PBLs de individuos sanos y se analizó la expresión de marcadores de diferenciación celular, de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 y de las moléculas implicadas en la citotoxicidad CD244, FasL y perforina. En estos resultados se demuestra que los linfocitos circulantes T CD8 específicos del antígeno Melan-A/MART-1 se caracterizan por tener un fenotipo de linfocito virgen CD8+, CD27+, CD28+, CD45RA+, CD45RO- y CCR7+ y por no expresar o expresar un bajo nivel de moléculas efectoras. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos de enfermos de melanoma por Pittet et al. en los que se observó que la mayoría de los

pacientes con melanoma (7 de cada 10) también presentan linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos con el fenotipo virgen CD45RA+ CD45RO- (Pittet et al. 1999).

Para la expansión de la población de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos se estimuló a los 0 y 7 días la fracción de células CD8+ con células autólogas de la fracción CD8- cargadas con el péptido Melan-A/MART-1 en presencia de IL-2 e IL-7. A los 14 días de cultivo se realizó el marcaje con los tetrámeros para analizar la expresión de marcadores de diferenciación y moléculas coestimuladoras. El fenotipo predominante que resultó de la estimulación *in vitro* de los linfocitos T específicos fue CD8+ CD27+ CD28+ CD45RA- CD45RO+ y CCR7-. Este fenotipo demuestra que durante la estimulación *in vitro* sucede un cambio en la expresión de las isoformas de CD45 y una pérdida del receptor CCR7 en comparación con los linfocitos en reposo. En el caso de las moléculas coestimuladoras, se observó una disminución del canal medio de fluorescencia durante la estimulación. Es importante señalar que estos mismos cambios fenotípicos suceden durante el proceso de diferenciación *in vivo* de los linfocitos T CD8 (Dutton et al. 1998).

Varios autores dividen el proceso de diferenciación celular en diferentes fases en función del fenotipo CD45RA y CCR7 (Jager et al. 2002; Sallusto et al. 1999), utilizando estos dos marcadores hemos podido estudiar la diferenciación *in vitro* tras el reconocimientos del antígeno.

Los linfocitos T CD8 específicos de sangre periférica mostraron un fenotipo CD45RA+ CCR7+, el cual, es característico de células vírgenes. Cuando las células fueron estimuladas *in vitro* pasaron a adquirir un fenotipo en el que el 80 ± 10 % de ellas fueron CD45RA- y un 92 ± 6 % de ellas CCR7-, de modo que el fenotipo que predomina después de la estimulación es el CD45RA- CCR7- que se definen como células efectoras/memoria (Jager et al., 2002).

Con estos datos se demuestra que la estimulación *in vitro* con el péptido Melan-A/MART-1 realizada en presencia de IL-2 e IL-7 consigue expandir eficazmente la población de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos. La mayoría de las células expandidas adquieren durante la estimulación un fenotipo efector/memoria, mientras que un pequeño porcentaje de células adquieren el fenotipo CCR7- que si estuviera coexpresado con CD45RA se las podría definir como células efectoras. Por tanto, la estimulación induce una diferenciación que se detiene en el estadio de linfocitos T CD8 de fenotipo efector/memoria, sin alcanzar el fenotipo efector de

linfocitos T CD8 específicos. Probablemente, si la estimulación *in vitro* de los linfocitos T CD8 específicos se realizara en un entorno de citoquinas diferente o quizás durante un periodo de tiempo mayor, se obtendrían linfocitos T efectores con capacidad citotóxica que podrían ser útiles para su uso en inmunoterapia.

Para conocer la expresión de moléculas efectoras de la citotoxicidad en los linfocitos T CD8 específicos se analizó la expresión de las moléculas de superficie CD244 y FasL y el contenido intracelular de perforina. La expresión de FasL y perforina en los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 circulantes de individuos sanos fue prácticamente nula, mientras que la expresión de CD244 presentó una alta variabilidad que osciló en un rango de 0 al 40 % en los diferentes individuos. Estos resultados corroboran los datos obtenidos en el análisis de los marcadores de diferenciación que demuestran que estas células tienen un fenotipo virgen.

Cuando se expandió la población de linfocitos T específicos por estimulación *in vitro*, la expresión de FasL y perforina intracelular no aumentó, sin embargo, la expresión de CD244 aumentó hasta el 49 ± 15 % del total de linfocitos T específicos.

Se ha observado que CD244 se expresa más débilmente en células de fenotipo memoria central CD45RA- CCR7+ que en células efectoras de fenotipo CD45RA+ CCR7- y que la disminución de CCR7 y el aumento de CD244 está correlacionado con la adquisición de fenotipo efector de células T (Speiser et al.,). Por todo ello podemos decir que la estimulación *in vitro* de los linfocitos T específicos induce una diferenciación predominante hacia un fenotipo efector/memoria CD45RA- CCR7- y que el aumento de CD244 podría indicar un posible inicio de la diferenciación hacia células de fenotipo efector.

Por otro lado, el hecho de que aumente la molécula CD244 en linfocitos T específicos podría utilizarse como un marcador del grado de diferenciación de las diferentes células T específicas de antígenos de melanoma. Además, al contrario que CD27 y CD28 que disminuyen su expresión en la activación de los linfocitos T, el aumento de CD244 que tiene lugar en el cambio a fenotipo efector podría proporcionar las señales coestimuladoras necesarias para aumentar la activación de linfocitos T CD8 específicos.

En estudios previos se ha observado la expresión de receptores inhibidores en linfocitos T específicos de antígenos tumorales (Bakker et al. 1998;Huard and

Karlsson, 2000). Teniendo en cuenta los cambios observados en la expresión de los receptores inhibidores en el total de linfocitos CD8 de sangre periférica de enfermos de melanoma, se abordó el estudio de la expresión de estos receptores en los linfocitos T específicos de antígenos de melanoma. Para ello se analizó la expresión de las moléculas EB6, gl183, NKB1, CD85, CD94 y NKG2A en la población de linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 en reposo y sometidos a estimulación *in vitro*.

Sorprendentemente la expresión de los receptores inhibidores EB6, gl183 y CD85 en linfocitos T específicos en reposo fue relativamente alta ($14 \pm 5 \%$, $10 \pm 10 \%$ y $13 \pm 9 \%$ respectivamente), sin embargo, cuando estas células son estimuladas *in vitro*, la expresión disminuye hasta hacerse prácticamente nula. Es necesario realizar ensayos funcionales de lisis para determinar el efecto de la presencia de estos receptores en la superficie de estos linfocitos, sin embargo, la expresión de estos receptores en linfocitos T en reposo podría ser el reflejo de un mecanismo de control de una respuesta inmune frente a antígenos propios, mientras que la desaparición de estos receptores en los linfocitos estimulados podría indicar una actividad citotóxica aumentada en estas células.

Con los datos obtenidos podríamos decir que la estimulación *in vitro* activa una diferenciación celular mayoritariamente hacia un fenotipo memoria y que el aumento de CD244 podría indicar el inicio del cambio de célula memoria a célula efectora. En este cambio hay un descenso paralelo de receptores inhibidores que podría incrementar la actividad citolítica de estos linfocitos frente a células de melanoma.

Mediante ensayos de ELISPOT se comprobó que los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 circulantes de individuos sanos no secretan IFN- γ en respuesta al péptido Melan-A/MART-1. La ausencia de la función efectora de estas células se correlaciona con el fenotipo virgen que presentan. Estas características fenotípicas y funcionales se han descrito en la mayoría de los enfermos de melanoma, sólo en algunos enfermos de melanoma con metástasis se ha comprobado la existencia de estas células con fenotipo efector/memoria y con función efectora, es decir, los linfocitos T CD8+ Melan-A/MART-1 específicos funcionales y de fenotipo efector/memoria se encuentran exclusivamente en enfermos de melanoma con metástasis aunque en este grupo de enfermos hay individuos con células que presentan el mismo fenotipo virgen que hemos observado en sangre periférica de individuos sanos (Dunbar et al., 2000).

Los ensayos de ELISPOT realizados con los linfocitos T CD8 específicos estimulados *in vitro* demuestran que hay una secreción de IFN- γ en respuesta al péptido para el que son específicos.

Por otro lado, los experimentos de CITOSPOT demostraron que los linfocitos T CD8 específicos estimulados *in vitro* secretan IFN- γ en respuesta a células de melanoma que presentan el péptido Melan-A/MART-1 con lo que se demuestra la funcionalidad de estas células. Resultados similares han sido publicados por otros autores (Dunbar et al., 2000).

En resumen, el estudio de la expresión de las moléculas coestimuladoras y de los receptores inhibidores en los linfocitos de sangre periférica de enfermos de melanoma nos ha permitido profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune antitumoral.

Por un lado, los experimentos llevados a cabo con la línea YT-Indy han demostrado que el receptor inhibidor KIR2DL2 modula la lisis de células de melanoma mediada por CD28, además hemos comprobado que éste es un buen modelo para determinar el efecto de moléculas coestimuladoras y de los receptores inhibidores en la lisis de células tumorales.

Por otro lado, el análisis fenotípico de los linfocitos T CD8 de enfermos de melanoma nos ha permitido identificar los cambios que suceden en la expresión de marcadores de diferenciación/activación, receptores NK y moléculas coestimuladoras en estos pacientes. En conjunto los resultados obtenidos sugieren que las células de estos pacientes están sometidas a un proceso de activación/diferenciación celular.

Finalmente, el análisis de linfocitos T CD8 específicos de antígenos de melanoma nos ha permitido estudiar los cambios en el fenotipo y la función de linfocitos T específicos inducidos por la estimulación *in vitro*. Tras la activación se observaron cambios en el fenotipo virgen hacia un fenotipo efector/memoria junto con la adquisición de capacidad funcional. El modelo de estimulación *in vitro* utilizado en este trabajo nos permitirá el estudio funcional de la expresión de receptores inhibidores y de moléculas coestimuladoras en la lisis de células tumorales mediada por linfocitos T específicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abken H., Hombach A., Heuser C., Kronfeld K. and Seliger B. Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? (2002) *Trends.Immunol.*; **23**, 240-245.
- Ackermann B., Engel B.C., Buttlies B., Zibert A. and Burdach S. (2002) Transgenic IL-2 expression in ewing tumor cell lines after transfection with starburst dendrimers and cationic liposomes. *Pediatr.Hematol.Oncol.* **19**, 509-520.
- Adrian C.F., Moreau P., Riteau B., Ibrahim E.C., Le Danff C., Dausset J., Rouas-Freiss N., Carosella E.D. and Paul P. (1999) HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J.Reprod.Immunol.* **43**, 183-193.
- Alegre M.L., Frauwirth K.A. and Thompson C.B. (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 220-228.
- Altin J.G. and Sloan E.K. (1997) The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol.Cell Biol.* **75**, 430-445.
- Antonia S.J., Extermann M. and Flavel R.A. (1998) Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit.Rev.Oncog.* **9**, 35-41.
- Arosa F.A. (2002) CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol.Cell Biol.* **80**, 1-13.
- Atkins M.B. Interleukin-2: clinical applications. (2002) *Semin.Oncol.*(3.Suppl.7.). **29**, 12-17.
- Bakker A.B., Phillips J.H., Figdor C.G. and Lanier L.L. (1998) Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J.Immunol.* **160**, 5239-5245.
- Barzegar C., Meazza R., Pereno R., Pottin-Clemenceau C., Scudeletti M., Brouty-Boye D., Doucet C., Taoufik Y., Ritz J., Musselli C., Mishal Z., Jasmin C., Indiveri F., Ferrini S. and Azzarone B. (1998) IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. *Oncogene* **16**, 2503-2512.
- Beck C., Schreiber H. and Rowley D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc.Res.Tech.*2001.Feb.15.; **52**, 387-395.
- Berd D. (2002) M-Vax: an autologous, hapten-modified vaccine for human cancer. *Expert.Opin.Biol.* **2**, 335-342.
- Bertone S., Schiavetti F., Bellomo R., Vitale C., Ponte M., Moretta L. and Mingari M.C. (1999) Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* **29**, 23-29.
- Boon T., Cerottini J.C., Van den Eynde B., van der Bruggen P. and Van Pel A. (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* **12**, 337-365.

- Borrego F., Kabat J., Kim D.K., Lieto L., Maasho K., Pena J., Solana R. and Coligan J.E. (2002) Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol.Immunol.* **38**, 637-660.
- Bottino C., Augugliaro R., Castriconi R., Nanni M., Biassoni R., Moretta L. and Moretta A. (2002) Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *Eur.J.Immunol.* **30**, 3718-3722.
- Brooks A.G., Borrego F., Posch P.E., Patamawenu A., Scorzelli C.J., Ulbrecht M., Weiss E.H. and Coligan J.E. (1999) Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J.Immunol.* **162**, 305-313.
- Buelens C., Willems F., Delvaux A., Pierard G., Delville J.P., Velu T. and Goldman M. (1995) Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **25**, 2668-2672.
- Bullani R.R., Huard B., Viard-Leveugle I., Byers H.R., Irmeler M., Saurat J.H., Tschopp J. and French L.E. (2001). Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J.Invest.Dermatol..Aug.;* **117**, 360-364.
- Burton R.C., Coates M.S., Hersey P., Roberts G., Chetty M.P., Chen S., Hayes M.H., Howe C.G. and Armstrong B.K. (1993) An analysis of a melanoma epidemic. *Int.J.Cancer* **55**, 765-770.
- Castelli C., Rivoltini L., Andreola G., Carrabba M., Renkvist N. and Parmiani G. (2000) T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J.Cell Physiol.* **182**, 323-331.
- Cerwenka A. and Lanier L.L. Natural killer cells, viruses and cancer. (2001)*Nat.Rev.Immunol.* **1**, 41-49.
- Chambers C.A., Kuhns M.S., Egen J.G. and Allison J.P. (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu.Rev.Immunol.* **19:565-94.**, 565-594.
- Chen L., Linsley P.S. and Hellstrom K.E. (1993) Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol.Today* **14**, 483-486.
- Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G. and Ravetch J.V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat.Med.* **6**, 443-446.
- Curiel-Lewandrowski C. and Atkins M.B. Immunotherapeutic approaches for the treatment of malignant melanoma. (2001)*Curr.Opin.Investig.Drugs.Nov.;* **2**, 1553-1563.

- D'Andrea A., Chang C., Phillips J.H. and Lanier L.L. (1996) Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J.Exp.Med.* **184**, 789-794.
- de Gruijl F.R., van Kranen H.J. and Mullenders L.H. (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J.Photochem.Photobiol.B.* **63**, 19-27.
- DelaRosa O., Tarazona R., Casado J.G., Alonso C., Ostos B., Pena J. and Solana R. (2002) Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp.Gerontol.* **37**, 213-217.
- Derre L., Corvaisier M., Pandolfino M.C., Diez E., Jotereau F. and Gervois N. (2002) Expression of CD94/NKG2-A on Human T Lymphocytes Is Induced by IL-12: Implications for Adoptive Immunotherapy. *J.Immunol.* **168**, 4864-4870.
- Dimaano C., Nguyen T., Ahmed A., Abel E., Schultz C.S. and Nieto M.C. (2000) A point mutation in beta2-microglobulin results in loss of epitope expression. *Tissue Antigens..Nov.;* **56**, 473-475.
- D'Souza S., Rimoldi D., Lienard D., Lejeune F., Cerottini J.C. and Romero P. (1998) Circulating Melan-A/Mart-1 specific cytolytic T lymphocyte precursors in HLA-A2+ melanoma patients have a memory phenotype. *Int.J.Cancer* **78**, 699-706.
- Dunbar P.R., Smith C.L., Chao D., Salio M., Shepherd D., Mirza F., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F., Evans A., Russell-Jones R., Harris A.L. and Cerundolo V. (2000) A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J.Immunol.* **165**, 6644-6652.
- Durrant L.G. (1997) Cancer vaccines. *Anticancer Drugs* **8**, 727-733.
- Dutton R.W., Bradley L.M. and Swain S.L. (1998) T cell memory. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 201-223.
- Eggermont A.M. (2002) European approach to the treatment of malignant melanoma. *Curr.Opin.Oncol.* **14**, 205-211.
- Fagnoni F.F., Vescovini R., Mazzola M., Bologna G., Nigro E., Lavagetto G., Franceschi C., Passeri M. and Sansoni P. (1996) Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology* **88**, 501-507.
- Fehniger T.A., Cooper M.A. and Caligiuri M.A. (2002) Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine.Growth Factor.Rev.* **13**, 169-183.
- Fenton R.G., Turcovski-Corrales S.M. and Taub D.D. (1998a) Induction of melanoma antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro by stimulation with B7-expressing human melanoma cell lines. *J.Immunother.* **21**, 95-108.

- Ferrone S. and Marincola F.M. (1995) Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol.Today* **16**, 487-494.
- Frumento G., Franchello S., Palmisano G.L., Nicotra M.R., Giacomini P., Loke Y.W., Geraghty D.E., Maio M., Manzo C., Natali P.G. and Ferrara G.B. (2000) Melanomas and melanoma cell lines do not express HLA-G, and the expression cannot be induced by gammaIFN treatment. *Tissue Antigens* **56**, 30-37.
- Galiani M.D., Aguado E., Tarazona R., Romero P., Molina I., Santamaria M., Solana R. and Pena J. (1999) Expression of killer inhibitory receptors on cytotoxic cells from HIV-1-infected individuals. *Clin.Exp.Immunol.* **115**, 472-476.
- Gamero A.M., Ussery D., Reintgen D.S., Puleo C.A. and Djeu J.Y. (1995) Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism. *Cancer Res.* **55**, 4988-4994.
- García Hortelano E., Benitez i Gomá J.R., Redondo Camacho A., De Haro Padilla J., Soto Cansino R., Rioja Torrejón L.F. (2000) Melanoma maligno: estudio epidemiológico y clínico en el área sanitaria de Córdoba y Jaén; *Cir. Plast. Iberlatinamer.* **26** 255-261
- Ge H. and Bao Z. (1996) [Human melanoma-specific peptide antigens recognized by HLA-A2 restricted tumor-infiltrating lymphocytes]. *Zhonghua.Yi.Xue.Za.Zhi.* **76**, 658-661.
- Gervois N., Labarriere N., Le Guiner S., Pandolfino M.C., Fonteneau J.F., Guilloux Y., Diez E., Dreno B. and Jotereau F. (2000) High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin.Cancer Res.* **6**, 1459-1467.
- Gibbs P., Brady B.M. and Robinson W.A. (2002) The genes and genetics of malignant melanoma. *J.Cutan.Med.Surg.* **6**, 229-235.
- Gorelik L. and Flavell R.A. (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 46-53.
- Greenfield E.A., Nguyen K.A. and Kuchroo V.K. (1998b) CD28/B7 costimulation: a review. *Crit.Rev.Immunol.* **18**, 389-418.
- Greenwald R.J., Latchman Y.E. and Sharpe A.H. (2002) Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* **14**, 391-396.
- Greil R., Egle A. and Villunger A. (1998) On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. *Leuk.Lymphoma.* **31**, 477-490.
- Grob J.J., Bastuji-Garin S., Vaillant L., Roujeau J.C., Bernard P., Sassolas B. and Guillaume J.C. (1996) Excess of nevi related to immunodeficiency: a study in

- HIV-infected patients and renal transplant recipients. *J.Invest.Dermatol.* **107**, 694-697.
- Guinan E.C., Gribben J.G., Boussiotis V.A., Freeman G.J. and Nadler L.M. (1994) Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* **84**, 3261-3282.
- Hamann D., Baars P.A., Rep M.H., Hooibrink B., Kerkhof-Garde S.R., Klein M.R. and van Lier R.A. (1997) Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J.Exp.Med.* **186**, 1407-1418.
- Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P. and Hodes R.J. (1994) Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J.Exp.Med.* **180**, 631-640.
- Hersey P. and Zhang X.D. (2001) How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat.Rev.Cancer* **1**, 142-150.
- Hishii M., Andrews D., Boyle L.A., Wong J.T., Pandolfi F., Van Den Elsen P.J. and Kurnick J.T. (1997) In vivo accumulation of the same anti-melanoma T cell clone in two different metastatic sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 1378-1383.
- Huard B. and Karlsson L. (2000) A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur.J.Immunol.* **30**, 1665-1675.
- Itoh K., Platsoucas C.D. and Balch C.M. (1987) Monocyte- and natural killer cell-mediated spontaneous cytotoxicity against human noncultured solid tumor cells. *Cell Immunol.* **108**, 495-500.
- Jager E., Hohn H., Necker A., Forster R., Karbach J., Freitag K., Neukirch C., Castelli C., Salter R.D., Knuth A. and Maeurer M.J. (2002) Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *Int.J.Cancer* **98**, 376-388.
- Kageshita T., Hirai S., Ono T., Hicklin D.J. and Ferrone S. (1999) Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am.J.Pathol.* **154**, 745-754.
- Kamarashev J., Ferrone S., Seifert B., Boni R., Nestle F.O., Burg G. and Dummer R. (2001) TAP1 down-regulation in primary melanoma lesions: an independent marker of poor prognosis. *Int.J.Cancer.*; **95**, 23-28.
- Kambayashi T., Assarsson E., Chambers B.J. and Ljunggren H.G. (2002) Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J.Immunol.* **167**, 6706-6710.
- Kawakami Y., Robbins P.F., Wang R.F. and Rosenberg S.A. (1996) Identification of tumor-regression antigens in melanoma. *Important.Adv.Oncol.* **3**, 3-21.

- Kern F., Ode-Hakim S., Vogt K., Hoflich C., Reinke P. and Volk H.D. (1996) The enigma of CD57+CD28- T cell expansion--anergy or activation? *Clin.Exp.Immunol.* **104**, 180-184.
- Kikuchi A., Nieda M., Schmidt C., Koezuka Y., Ishihara S., Ishikawa Y., Tadokoro K., Durrant S., Boyd A., Juji T. and Nicol A. (2001) In vitro anti-tumour activity of alpha-galactosylceramide-stimulated human invariant Valpha24+NKT cells against melanoma. *Br.J.Cancer* **85**, 741-746.
- Kim C.J., Dessureault S., Gabrilovich D., Reintgen D.S. and Slingluff C.L.J. (2002) Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control.* **9**, 22-30.
- Lauerova L., Dusek L., Simickova M., Kocak I., Vagundova M., Zaloudik J. and Kovarik J. (2002) Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma.* **49**, 159-166.
- Leger-Ravet M.B., Mathiot C., Portier A., Brandely M., Galanaud P., Fridman W.H. and Emilie D. (1994) Increased expression of perforin and granzyme B genes in patients with metastatic melanoma treated with recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol.Immunother.* **39** , 53-58.
- Lenschow D.J., Walunas T.L. and Bluestone J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* **14.**, 233-258.
- Li T., Harada M., Tamada K., Abe K. and Nomoto K. (1997) Repeated restraint stress impairs the antitumor T cell response through its suppressive effect on Th1-type CD4+ T cells. *Anticancer Res.* **17**, 4259-4268.
- Liebowitz D.N., Lee K.P. and June C.H. (1998) Costimulatory approaches to adoptive immunotherapy. *Curr.Opin.Oncol.* **10**, 533-541.
- Long E.O. (2002a) Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin.Cancer Biol.* **12**, 57-61.
- Lopez-Botet M., Llano M., Navarro F. and Bellon T. (2000) NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin.Immunol.* **12**, 109-119.
- Mackensen A., Wittnebel S., Veelken H., Noppen C., Spagnoli G.C. and Lindermann A. (1999) Induction and large-scale expansion of CD8+ tumor specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood lymphocytes by in vitro stimulation with CD80-transfected autologous melanoma cells. *Eur.Cytokine.Netw.* **10**, 329-336.
- Maio M., Fonsatti E., Lamaj E., Altomonte M., Cattarossi I., Santantonio C., Melani C., Belli F., Arienti F., Colombo M.P. and Parmiani G. (2002) Vaccination of stage IV patients with allogeneic IL-4- or IL-2-gene-transduced melanoma cells generates functional antibodies against vaccinating and autologous melanoma cells. *Cancer Immunol.Immunother.*; **51**, 9-14.
- Marchand M., Brichard V., van Baren N. and Coulie P.G. (2001) Biological and clinical developments in melanoma vaccines. *Expert.Opin.Biol.Ther.;1.(3.):* **1**, 497-510.

- Markel G., Lieberman N., Katz G., Arnon T.I., Lotem M., Drize O., Blumberg R.S., Bar-Haim E., Mader R., Eisenbach L. and Mandelboim O. (2002) CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J.Immunol.* **168**, 2803-2810.
- Mavroukakis S.A., Muehlbauer P.M., White R.L.J. and Schwartzentruber D.J (2001). Clinical pathways for managing patients receiving interleukin 2. *Clin.J.Oncol.Nurs.*; **5**, 207-217.
- McCarthy D.O., Glowacki N., Schell K., Emler C.A. and Albertini M.R. (2000) Antigenicity of human melanoma cells transfected to express the B7-1 co-stimulatory molecule (CD80) varies with the level of B7-1 expression. *Cancer Immunol.Immunother.* **49**, 85-93.
- Melero I., Bach N. and Chen L. (1997) Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens. *Life Sci.* **60**, 2035-2041.
- Metelitsa L.S., Naidenko O.V., Kant A., Wu H.W., Loza M.J., Perussia B., Kronenberg M. and Seeger R.C. (2001) Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J.Immunol.* **167**, 3114-3122.
- Millar B.C., Bell J.B. and Powles R.L. (1996) Lymphocyte recovery and clinical response in multiple myeloma patients receiving interferon alpha 2 beta after intensive therapy. *Br.J.Cancer* **73**, 236-240.
- Miller J.S. (2002) Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest.*;20.(3.): **20**, 405-419.
- Miller J.S. (2001) The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp.Hematol..Oct..-68.* **29**, 1157-1168.
- Mingari M.C., Ponte M., Bertone S., Schiavetti F., Vitale C., Bellomo R., Moretta A. and Moretta L. (1998) HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 1172-1177.
- Mitchell M.S. (2002) Cancer vaccines, a critical review--Part I. *Curr.Opin.Investig.Drugs* **3**, 140-149.
- Monfurro V., Nagorsen D., Wang E., Provenzano M., Dudley M.E., Rosenberg S.A. and Marincola F.M. (2002) Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells. *J.Immunol.* **168**, 5933-5942.
- Montel A.H., Bochan M.R., Hobbs J.A., Lynch D.H. and Brahmi Z. (1995) Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol.* **166**, 236-246.
- Moretta A. and Moretta L. (1997) HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr.Opin.Immunol.* **9**, 694-701.

- Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C., Biassoni R. and Moretta L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* **19**:197-223., 197-223.
- Moretta L., Bottino C., Cantoni C., Mingari M.C. and Moretta A. (2001) Human natural killer cell function and receptors. *Curr.Opin.Pharmacol.* **1**, 387-391.
- Moretti S., Chiarugi A., Semplici F., Salvi A., De Giorgi V., Fabbri P. and Mazzoli S. (2001) Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. *Melanoma.Res.* **11**, 395-399.
- Moser J.M., Gibbs J., Jensen P.E. and Lukacher A.E. (2002) CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat.Immunol.* **3**, 189-195.
- Mulcahy K.A., Alexander S., Platts K.E., Wardle C., Sisley K., Rennie I.G. and Murray A.K. (2002) CD80-mediated induction of immunostimulation in two ocular melanoma cell lines is augmented by interferon-gamma. *Melanoma.Res.* **12**, 129-138.
- Nasca R. and Carbone E. (1999) Natural killer cells as potential tools in melanoma metastatic spread control. *Oncol.Res.* **11**, 339-343.
- Natarajan K., Dimasi N., Wang J., Mariuzza R.A. and Margulies D.H. (2002) Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu.Rev.Immunol.* **20**:853-85., 853-885.
- Nathan P.D. and Eisen T.G. (2002) The biological treatment of renal-cell carcinoma and melanoma. *Lancet Oncol.*;3.(2.):89.-96. **3**, 89-96.
- Noppen C., Schaefer C., Zajac P., Schutz A., Kocher T., Kloth J., Heberer M., Colonna M., De Libero G. and Spagnoli G.C. (1998) C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity. *Eur.J.Immunol.* **28**, 1134-1142.
- Oelke M., Moehrl U., Chen J.L., Behringer D., Cerundolo V., Lindemann A. and Mackensen A. (2000) Generation and purification of CD8+ melan-A-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive transfer in tumor immunotherapy. *Clin.Cancer Res.* **6**, 1997-2005.
- Ohkawa T., Seki S., Dobashi H., Koike Y., Habu Y., Ami K., Hiraide H. and Sekine I. (2001) Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. *Immunology* **103**, 281-290.
- Padovan E., Spagnoli G.C., Ferrantini M. and Heberer M. (2002) IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *J.Leukoc.Biol.*;71.(4.):669.-76. **71**, 669-676.

- Parmiani G., Castelli C., Dalerba P., Mortarini R., Rivoltini L., Marincola F.M. and Anichini A. (2002) Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J.Natl.Cancer Inst..Jun.5.;94.(11.):805.-18.* **94**, 805-818.
- Pasche B.(2001) Role of transforming growth factor beta in cancer. *J.Cell Physiol.. 186.(2.):153.-68.* **186**, 153-168.
- Paul P., Rouas-Freiss N. and Carosella E.D. (1999) [HLA-G: a tolerance molecule implicated in the escape of tumors from immunosurveillance]. *Pathol.Biol.(Paris.)* **47**, 766-770.
- Pawelec G., Effros R.B., Caruso C., Remarque E., Barnett Y. and Solana R. (1999) T cells and aging (update february 1999). *Front.Biosci.* **4:D216-69.**, D216-D269
- Perez B., Benitez R., Fernandez M.A., Oliva M.R., Soto J.L., Serrano S., Lopez N.M. and Garrido F. (1999) A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens.* **53**, 569-572.
- Phan G.Q., Wang E. and Marincola F.M. (2001) T-cell-directed cancer vaccines: mechanisms of immune escape and immune tolerance. *Expert.Opin.Biol.Ther..May.;* **1**, 511-523.
- Pittet M.J., Speiser D.E., Lienard D., Valmori D., Guillaume P., Dutoit V., Rimoldi D., Lejeune F., Cerottini J.C. and Romero P. (2001) Expansion and functional maturation of human tumor antigen-specific CD8+ T cells after vaccination with antigenic peptide. *Clin.Cancer Res.* **7**, 796s-803s.
- Pittet M.J., Speiser D.E., Valmori D., Cerottini J.C. and Romero P. (2000) Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J.Immunol.* **164**, 1148-1152.
- Pittet M.J., Valmori D., Dunbar P.R., Speiser D.E., Lienard D., Lejeune F., Fleischhauer K., Cerundolo V., Cerottini J.C. and Romero P. (1999) High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J.Exp.Med.* **190**, 705-715.
- Polakova K. and Russ G. (2000) Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma.* **47**, 342-348.
- Radvanyi L.G., Banerjee A., Weir M. and Messner H. (1999) Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand.J.Immunol.* **50**, 499-509.
- Ramirez-Montagut T., Andrews D.M., Ihara A., Pervaiz S., Pandolfi F., Van Den Elsen P.J., Waitkus R., Boyle L.A., Hishii M. and Kurnick J.T. (2000) Melanoma antigen recognition by tumour-infiltrating T lymphocytes (TIL): effect of differential expression of melan-A/MART-1. *Clin.Exp.Immunol.* **119**, 11-18.

- Real L.M., Cabrera T., Canton J., Oliva R., Ruiz-Cabello F. and Garrido F. (1999) Looking for HLA-G expression in human tumours. *J.Reprod.Immunol.* **43**, 263-273.
- Rivero J., Limonta M., Aguilera A., Fraga M. and Lopez S.P. (1994) Use of recombinant interferon-alpha in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals. *Biotherapy* **8**, 23-31.
- Romero P., Ortega C., Palma A., Molina I.J., Pena J. and Santamaria M. (2001) Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD4(+) T cells in response to CD3-mediated stimulation. *J.Leukoc.Biol.* **70**, 219-224.
- Ross P.M. (1989) Apparent absence of a benign precursor lesion: implications for the pathogenesis of malignant melanoma. *J.Am.Acad.Dermatol.* **21**, 529-538.
- Ruiz-Cabello F., Klein E. and Garrido F. (1991) MHC antigens on human tumors. *Immunol.Lett.* **29**, 181-189.
- Runger T.M., Epe B. and Moller K. (1995) Processing of directly and indirectly ultraviolet-induced DNA damage in human cells. *Recent.Results.Cancer Res.* **139**, 31-42.
- Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M. and Lanzavecchia A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712.
- Sato T., McCue P., Masuoka K., Salwen S., Lattime E.C., Mastrangelo M.J. and Berd D. (1996) Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin.Cancer Res.* **2**, 1383-1390.
- Schultze J., Nadler L.M. and Gribben J.G. (1996) B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev.* **10**, 111-127.
- Seliger B., Bock M., Ritz U. and Huber C. (2002) High frequency of a non-functional TAP1/LMP2 promoter polymorphism in human tumors. *Int.J.Oncol.*;20.(2.):349.-53. **20**, 349-353.
- Seo N., Hayakawa S. and Tokura Y. (2002) Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells. *Semin.Cancer Biol.* **12**, 291-300.
- Slominski A., Wortsman J., Carlson A.J., Matsuoka L.Y., Balch C.M. and Mihm M.C. (2001) Malignant melanoma. *Arch.Pathol.Lab.Med.*;125.(10.):1295.-306. **125**, 1295-1306.
- Sondak V.K. (2001) Use of adjuvant therapy in cutaneous melanoma. *Expert.Rev.Anticancer Ther.*;1.(3.):421.-6. **1**, 421-426.
- Spagnoli G.C., Schaefer C., Willimann T.E., Kocher T., Amoroso A., Juretic A., Zuber M., Luscher U., Harder F. and Heberer M. (1995) Peptide-specific CTL in tumor infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-

- 1/Melan-A, gp100 and Tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A2.1-positive patients. *Int.J.Cancer* **64**, 309-315.
- Speiser D.E., Colonna M., Ayyoub M., Cella M., Pittet M.J., Batard P., Valmori D., Guillaume P., Lienard D., Cerottini J.C. and Romero P. (2001) The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8⁺ effector alpha beta T cells. *J.Immunol.* **167**, 6165-6170.
- Speiser D.E., Pittet M.J., Valmori D., Dunbar R., Rimoldi D., Lienard D., MacDonald H.R., Cerottini J.C., Cerundolo V. and Romero P. (1999a) In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **190**, 775-782.
- Speiser D.E., Valmori D., Rimoldi D., Pittet M.J., Lienard D., Cerundolo V., MacDonald H.R., Cerottini J.C. and Romero P. (1999b) CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur.J.Immunol.* **29**, 1990-1999.
- Spitler L.E. (2002) Adjuvant therapy of melanoma. *Oncology (Huntingt.)*. **16**(1.Suppl.1.): 40-48.
- Steinbrink K., Jonuleit H., Muller G., Schuler G., Knop J. and Enk A.H. (1999) Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634-1642.
- Sule N.S., Nerurkar R.P. and Kamath S. (2001) Interleukin-2 as a therapeutic agent. *J.Assoc.Physicians.India.;* **49:897-900**.
- Sun W. and Schuchter L.M. (2001) Metastatic melanoma. *Curr.Treat.Options.Oncol.;* **2**(3.): 193-202.
- Takahashi K., Ono K., Hirabayashi Y. and Taniguchi M. (1988) Escape mechanisms of melanoma from immune system by soluble melanoma antigen. *J.Immunol.* **140**, 3244-3248.
- Takeda K., Smyth M.J., Cretney E., Hayakawa Y., Yamaguchi N., Yagita H. and Okumura K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol.* **214**, 194-200.
- Tarazona R., Borrego F., Galiani M.D., Aguado E., Pena J., Coligan J.E. and Solana R. (2002) Inhibition of CD28-mediated natural cytotoxicity by KIR2DL2 does not require p56(lck) in the NK cell line YT-Indy. *Mol.Immunol.* **38**, 495-503.
- Tarazona R., DelaRosa O., Alonso C., Ostos B., Espejo J., Pena J. and Solana R. (2000) Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech.Ageing Dev.* **121**, 77-88.

- Tarazona R., DelaRosa O., Casado J.G., Torre-Cisneros J., Villanueva J.L., Galiani M.D., Pena J. and Solana R. (2002) NK-associated receptors on CD8 T cells from treatment-naive HIV-infected individuals: defective expression of CD56. *AIDS*. **16**, 197-200.
- Teicher B.A. (2001) Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev.*;20.(1.-2.): **20**, 133-143.
- Teng J.M., Liu X.R., Mills G.B. and Dupont B. (1996) CD28-mediated cytotoxicity by the human leukemic NK cell line YT involves tyrosine phosphorylation, activation of phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C. *J.Immunol.* **156**, 3222-3232.
- Trimble L.A., Kam L.W., Friedman R.S., Xu Z. and Lieberman J. (2000) CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood* **96**, 1021-1029.
- Tsujitani S., Nakashima M., Watanabe T., Kaibara N., Koprowski H. and Steplewski Z. (1995) Cytokine combinations for induction of antigen-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood lymphocytes. *Anticancer Res.* **15**, 655-660.
- Turcovski-Corrales S.M., Fenton R.G., Peltz G. and Taub D.D. (1995) CD28:B7 interactions promote T cell adhesion. *Eur.J.Immunol.* **25**, 3087-3093.
- Ugolini S., Arpin C., Anfossi N., Walzer T., Cambiaggi A., Forster R., Lipp M., Toes R.E., Melief C.J., Marvel J. and Vivier E. (2001) Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. *Nat.Immunol.*;2.(5.): **2** , 430-435.
- Urosevic M., Trojan A. and Dummer R. (2002) HLA-G and its KIR ligands in cancer--another enigma yet to be solved? *J.Pathol.* **196**, 252-253.
- Valmori D., Dutoit V., Lienard D., Lejeune F., Speiser D., Rimoldi D., Cerundolo V., Dietrich P.Y., Cerottini J.C. and Romero P. (2001) Tetramer-guided analysis of TCR beta-chain usage reveals a large repertoire of melan-A-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *J.Immunol.* **165**, 533-538.
- Valmori D., Scheibenbogen C., Dutoit V., Nagorsen D., Asemissen A.M., Rubio-Godoy V., Rimoldi D., Guillaume P., Romero P., Schadendorf D., Lipp M., Dietrich P.Y., Thiel E., Cerottini J.C., Lienard D. and Keilholz U. (2002) Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res.* **62**, 1743-1750
- Vetter C.S., Straten P.T., Terheyden P., Zeuthen J., Brocker E.B. and Becker J.C. (2000) Expression of CD94/NKG2 subtypes on tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic melanoma. *J.Invest.Dermatol.* **114**, 941-947.
- Wang E., Phan G.Q. and Marincola F.M (2001). T-cell-directed cancer vaccines: the melanoma model. *Expert.Opin.Biol.Ther.*;1.(2.):277.-90. **1**, 277-290.

- Warren H.S. and Kinnear B.F. (1999) Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J.Immunol.* **162**, 735-742.
- Weber J. (2002) Peptide vaccines for cancer. *Cancer Invest.*;20.(2.):208.-21.
- Whiteside T.L. and Herberman R.B. (1990) The biology of human natural killer cells. *Ann.Ist.Super.Sanita.* **26**, 335-348.
- Wilson J.L., Charo J., Martin-Fontecha A., Dellabona P., Casorati G., Chambers B.J., Kiessling R., Bejarano M.T. and Ljunggren H.G. (1999) NK cell triggering by the human costimulatory molecules CD80 and CD86. *J.Immunol.* **163**, 4207-4212.
- Wolchok J.D. and Livingston P.O. (2001) Vaccines for melanoma: translating basic immunology into new therapies. *Lancet Oncol.*;2.(4). **2**, 205-211.
- Xie K. and Fidler I.J. (1998) Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev.* **17**, 55-75.
- Xie K., Dong Z. and Fidler I.J. (1996) Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. *J.Leukoc.Biol.* **59**, 797-803.
- Yamana H. and Itoh K. (2000) [Specific immunotherapy with cancer vaccines]. *Gan.To.Kagaku.Ryoho.* **27**, 1477-1488.
- Yarosh D.B. and Kripke M.L. (1996) DNA repair and cytokines in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat.Res.* **350**, 255-260.
- Young J.L., Ramage J.M., Gaston J.S. and Beverley P.C. (1997) In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2383-2390.
- Zarour H.M., Maillere B., Brusica V., Coval K., Williams E., Pouvelle-Moratille S., Castelli F., Land S., Bennouna J., Logan T. and Kirkwood J.M. (2002) NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res.* **62**, 213-218.
- Zeng G., Li Y., El-Gamil M., Sidney J., Sette A., Wang R.F., Rosenberg S.A. and Robbins P.F. (2001) Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res.* **62**, 3630-3635.