

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A
MELANOMA DERIVADOS DEL RECEPTOR
MELANOCORTINA 1 (MC1R).**

**TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO
MENCIÓN MORFOFISIOPATOLOGÍA Y CITODIAGNÓSTICO**

Autor: Antonio Enrique Serrano Gómez

Director: Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray.

2000

A mi mamá

Trabajo realizado en el Laboratorio Central del Programa de Inmunología, del
Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios

A Flavio por su enseñanza de altísimo nivel en mis primeros pasos en la ciencia

A Meche por sus consejos y sobretodo por su amistad.

*A Alejo, Mónica y Adam, por ser más que compañeros de laboratorio, un grupo de
verdaderos amigos*

*A todos aquellos alumnos que una vez iniciaron este camino y que compartieron los
momentos más difíciles y las sonrisas más alegres.*

Gracias

INDICE:

	<i>página</i>
ABREVIATURAS:	6
RESUMEN:	7
INTRODUCCIÓN:	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	16
MATERIAL Y MÉTODOS:	17
RESULTADOS:	26
DISCUSIÓN:	33
CONCLUSIONES:	37
BIBLIOGRAFÍA:	38

ABREVIATURAS:

ACTH:	Hormona adenocorticotrópica
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico.
APC:	Célula presentadora de antígeno
CTL:	Linfocitos T citotóxicos
DC:	Célula dendrítica
HLA:	Antígeno leucocítico humano
IFN:	Interferón
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos.
IL:	Interleuquina
MCRs:	Receptores melanocortínicos
MC1R:	Receptor melanocortina 1
MHC:	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
NK:	Células agresoras naturales
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
POMC:	Molécula precursora propiomelanocortínica.
TCR:	Receptor célula T
TAP	Proteína asociada a transporte de antígenos
TIL:	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF:	Factor de Necrosis Tumoral
MSH:	Hormona melanocítica estimulante.

RESUMEN:

El creciente interés por una posible inmunoterapia contra el melanoma maligno ha incrementado la investigación acerca de los antígenos asociados a tumor que puedan ser reconocidos por células citotóxicas específicas. Pertenece a este grupo de antígenos, el ligando natural de la hormona α -MSH, el Receptor Melanocortina 1 (MC1R), del cual se describe actividad inmunoespecífica contra péptidos derivados de éste y presentados en el contexto de MHC clase I en pacientes con melanoma.

Con el fin de aumentar el conocimiento de las características del antígeno asociado a melanoma MC1R, se planteó caracterizar su distribución en tejidos melanómicos y normales humanos y sus propiedades inmunoespecíficas.

Se determinó que existe una importante expresión de la proteína MC1R en tejidos de melanoma primario cutáneo, metástasis linfática, metástasis a distancia y neoplasias de origen uveal, como también en células de melanoma cultivadas *in vitro*. MC1R pudo también ser detectado en células normales como los queratinocitos y los melanocitos, pero los niveles de expresión son significativamente menores a los observados en melanoma.

No fue posible obtener linfocitos citotóxicos inducidos al reconocimiento peptídico que pudiesen reconocer a péptidos derivados de MC1R y a células de melanoma, probablemente causado por una pérdida de la especificidad del cultivo CTL por apoptosis de linfocitos sobre-estimulados por citoquinas como IL-2, fenómeno comúnmente observado *in vitro*.

INTRODUCCIÓN:

1. *Melanoma:*

A pesar de los importantes avances de la medicina en la lucha contra el cáncer, se ha registrado un espectacular aumento en la incidencia del melanoma maligno a escala mundial en los últimos cuarenta años. Esta incidencia estaría relacionada a la sobre exposición de las personas a la luz solar, en especial a los rayos ultravioleta B y a la disminución concomitante de la capa de ozono (Woodhead *et al* 1999). Otros factores importantes en relación con melanoma, lo constituyen los antecedentes genéticos e inmunológicos, la exposición a carcinógenos y la preexistencia de nevus comunes. El melanoma puede afectar a adultos y personas jóvenes, siendo una importante causa de muerte en países desarrollados (Fauci *et al* 1998).

Los melanomas se originan a partir de la transformación maligna de los melanocitos, células derivadas de la cresta neural. Pueden aparecer en cualquier lugar de la piel y mucosas, como también en la uvea e iris. Histológicamente pueden describirse varios tipos de ellos, de acuerdo a su nivel diferencial de pigmentación (Cotran *et al* 1995). Considerando su evolución natural, los melanomas atraviesan la membrana basal del epitelio y se trasladan a través de los vasos linfáticos a ganglios regionales y por diseminación hematógona colonizan con mayor frecuencia hígado, pulmón, tracto gastrointestinal, hueso o sistema nervioso central (Rosai 1996). Los melanomas además pueden expandirse localmente, fenómeno que se conoce como metástasis satélite. Mención especial merece el melanoma derivado de úvea, ya que es la neoplasia intraocular más común en el adulto y sus metástasis tienen como destino preferencial el tejido hepático (Albert *et al* 1992).

El tratamiento que dispone la medicina en la actualidad se basa en primera instancia

en la erradicación del tumor mediante cirugía, donde la extirpación local de lesiones cutáneas de pequeño tamaño y que no traspasan la membrana basal del epitelio da buenos resultados.

Cuando las células tumorales han superado esta barrera y se diseminan producen las llamadas metástasis. Las células neoplásicas, a diferencia de las normales, entran en un estado de constante y descontrolada proliferación. Es esta característica de división activa, la que es aprovechada utilizando la radio y quimioterapia que apuntan a la destrucción celular atacando el DNA durante la mitosis (Palomo et al 1998).

Aún cuando se han experimentado grandes avances relacionados a estas terapias en otros tipos de cáncer, los resultados de los tratamientos tradicionales en la enfermedad metastásica de melanoma son decepcionantes, lo que hace imprescindible la utilización de tratamientos alternativos basados en el diagnóstico precoz y el desarrollo de nuevas estrategias para tratar la enfermedad. Una de ellas es la inmunoterapia del cáncer, la cual trata de inducir respuestas del sistema inmune contra los tumores malignos (Fauci *et al* 1998).

2. *Inmunología anti-tumoral:*

A comienzos del siglo XX los experimentos de Paul Ehrlich cimentaron las bases de lo que más tarde se conocería como inmunidad anti-tumoral. En aquellas experiencias se observó que los tumores que eran trasplantados de un animal de experimentación a otro sano solían involucionar en este último. Tiempo después, estas observaciones cayeron en el descrédito al conocerse los mecanismos inmunológicos de rechazo a tejidos trasplantados. Sin embargo, la obtención de ratones singénicos en década de los 50, y los resultados experimentales de regresión de tumores obtenidos con estas cepas, permiten a Sir

McFarlane Burnet y Lewis Thomas proponer en la década del 70 la teoría de la inmunovigilancia anti-tumoral. Esta teoría postula que una de las principales funciones del sistema inmune sería la de mantener al organismo libre de microorganismos patógenos y de células neoplásicas (Burnett 1970).

Los mecanismos inmunológicos que se ponen en juego contra los tumores son variados, entre los cuales existen elementos de la respuesta innata, como las células NK y los macrófagos, de la respuesta mediada por los anticuerpos, y principalmente de la inmunidad celular mediada por los linfocitos T, especialmente los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) (Stites *et al* 1994).

En la actualidad la inmunología anti-tumoral engloba el estudio de: las respuestas inmunes adquiridas frente a los tumores, la identificación de los antígenos de las células tumorales que inducen respuesta, los mecanismos efectoros y los métodos de prevención inmunológica e inmunoterapia del cáncer. La profundización en el estudio de esta disciplina ha permitido desarrollar estrategias de inmunoterapia anti-tumoral, que incluyen la estimulación no específica del sistema inmune mediante coadyuvantes o citoquinas, la terapia pasiva con anticuerpos anti-tumorales y la inmunización activa contra tumores a través de la transfección de células tumorales con genes de citoquinas o de moléculas coestimuladoras para elevar su inmunogenicidad. Otras estrategias son el tratamiento celular adoptivo de transferencia de células efectoras con reactividad anti-tumoral activadas *in vitro*, las llamadas LAK, o el tratamiento con linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) (Fernández *et al* 1998).

3. *Mecanismos de escape tumoral:*

Individuos inmunocompetentes desarrollan neoplasias mortales, por lo que la acción del sistema inmune es probablemente modulada por características propias de las células malignas. Se han identificado tumores que poseen la capacidad de secretar citoquinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) o la interleuquina 10 (IL-10) (Salazar-Onfray 1999). Otras células tumorales pueden perder estructuras fundamentales para el reconocimiento antigénico, como las moléculas principales de histocompatibilidad (MHC) (Hurks *et al* 2000). Otras formas de evadir el sistema inmune lo constituyen la pérdida, por parte del tumor, de moléculas de adhesión requeridas por los linfocitos para activarse, la adquisición de estructuras que aumentan sus posibilidades metastásicas, la expresión de moléculas homólogas a proteínas de regulación del complemento y la secreción de mediadores que inducen apoptosis en células inflamatorias (Geertsen *et al* 1999).

Es por ello que un importante objetivo de la investigación oncológica actual es el desarrollo de formas de aumentar las respuestas inmunes del huésped frente a los tumores y evitar los mecanismos de escape mediados por el tumor.

4. Antígenos tumorales:

La transformación maligna de tejidos propios normales está asociada a la expresión de moléculas en la superficie de las células tumorales que pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune específico. Los llamados antígenos tumorales son dianas capaces de inducir respuestas dirigidas contra las células neoplásicas que los expresan. De hecho, varias observaciones clínicas y experimentales sugieren que los tumores pueden estimular respuestas inmunes en sus huéspedes. (Abbas *et al* 2000).

Los antígenos tumorales de mayor relevancia en la actualidad son aquellos que son reconocidos por los linfocitos T CD8+. Los CTL son células que a través de su molécula TCR reconocen péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos en el contexto de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase I. Estos péptidos derivan de proteínas, principalmente endógenas, las que son procesadas intracelularmente en la mayoría de las células nucleadas del organismo. El MHC clase I es una glicoproteína de transmembrana de 44 kD con 3 dominios alfa ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) unida de forma no covalente a un polipéptido de 12 kD no polimórfico llamado microglobulina $\beta 2$. Los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ forman un bolsillo en el cual se presenta el péptido procesado. El gen que codifica para esta molécula en humanos se denomina HLA, es altamente polimórfico y destacan los alelos HLA-A1 y HLA-A2 expresados en el 25-30% y 45-55% de los individuos caucásicos, respectivamente. Es por esta razón que éstos son los alelos más estudiados en la investigación oncológica (Fauci 1998).

Los antígenos tumorales derivan de una gran variedad de proteínas las que según su origen y características pueden ser agrupados en: antígenos oncofetales, antígenos tejido-específicos, antígenos derivados de proteínas con mutaciones puntuales y de genes silentes, antígenos derivados de proteínas oncogénicas y antígenos derivados de proteínas virales relacionados a ciertas neoplasias (Roitt *et al* 1998). Estos antígenos han sido identificados mediante métodos bioquímicos genéticos o de inmunología reversa. Este último consiste en predecir péptidos afines a determinadas moléculas HLA, que deriven de proteínas caracterizadas de tumor, a través de un análisis por ordenador, y que pueden servir como antígenos asociados a tumor (Gulukota *et al* 1997).

En melanoma existen muchos datos que sugieren que esta neoplasia es susceptible

al reconocimiento por las células citotóxicas. Avalan estas evidencias, el hecho de que histológicamente se observan infiltrados mononucleares de LT, NK e hiperplasia en los ganglios linfáticos regionales. Las correlaciones histopatológicas muestran que la presencia de infiltrados linfocíticos en el melanoma se asocia a un mejor pronóstico en comparación con aquellos tumores con un infiltrado linfocitario T menor (Abbas *et al* 2000). Los CTL realizan sus funciones efectoras lisando la célula blanco vía gránulos citolíticos, lo que termina con la inducción de la apoptosis.

Los principales antígenos asociados a melanomas expresados en la superficie celular asociados a MHC, se involucran en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, control de la pigmentación y calidad de la melanina (Castelli *et al* 2000).

Se han identificado antígenos derivados de proteínas melanosomales como Melan-A/Mart-1, MAGE 1, 2 y 3, gp-100, gp75, TRP-2 y tirosinasa (Coulie *et al* 1994, Kawakami *et al* 1994a, Kawakami *et al* 1994b Brichard *et al* 1993 y Wofel *et al* 1994). La existencia de CTL específicos contra estos antígenos en los pacientes con melanoma, podría deberse a una sobre expresión de estas proteínas en las células cancerosas con respecto al tejido normal, lo que gatillaría la respuesta inmune.

En los últimos años varios grupos de investigadores han centrado sus estudios en describir nuevos antígenos tumorales asociados a melanoma, con la perspectiva de desarrollar inmunoterapias efectivas. Un antígeno recientemente clonado es el Receptor Melanocortina 1 (MC1R) (Salazar-Onfray *et al* 1997).

5. *Receptor Melanocortina 1 (MC1R):*

MC1R es una proteína de 35 kD, que consta de 7 dominios transmembránicos

(Tatro *et al* 1990), y pertenece a una nueva familia de receptores melanocortínicos, en donde cinco diferentes genes codifican para distintos MCRs (Chhajlani & Wikberg 1992). Se encuentra localizado tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma y su síntesis es inducible (Chakraborty *et al* 1991). El MC1R es altamente afín a su ligando natural, la Hormona Melanocítica Estimulante α (α -MSH). Esta hormona es un tridecapéptido litocorticotropo secretado por la *pars intermedia* de la hipófisis (Pumarino 1984), que deriva de la molécula precursora propiomelanocortínica POMC. De acuerdo con la estructura primaria, el POMC está íntimamente relacionado con la hormona adenocorticotrópica ACTH, incluso ésta tiene leve actividad melanocítica estimulante, pero es completamente diferente de otras hormonas derivadas de POMC como β -MSH, γ -MSH y β endorfina (Eberle 1998).

La unión de α -MSH activa la proteína G (Frandsberg *et al* 1998) e incrementa la acumulación de cAMP y de calcio citosólico (McNeil *et al* 1990), activando la proteína quinasa C (Buffey *et al* 1991). Todo esto provoca que los melanocitos, presentes en abundancia entre la dermis y la epidermis, formen el pigmento melanina y lo dispersen por la piel (Guyton & Hall 1998, Suzuki *et al* 1996). Otros datos sugieren que en melanoma, la presencia de MC1R es altamente variable postulándose que los receptores de MSH fluctúan en el ciclo de las células del tumor (Xia *et al* 1996).

Se ha acumulado evidencia que indica que el neuropéptido α -MSH, siendo una hormona pigmentaria, también jugaría un rol crucial en la regulación de las respuestas inmunes (Bhardwaj *et al* 1997). La MSH- α funciona como un antagonista de las citoquinas pro-inflamatorias, inhibiendo la actividad de IL-1 β , IL-6 y TNF, bloqueando la síntesis de IFN- γ (Robertson *et al* 1988, Hiltz *et al* 1992) e incrementando la producción de citoquinas

inmunosupresoras como IL-10 en monocitos humanos (Bhardwaj *et al* 1996).

Salazar-Onfray y cols, utilizando el método de inmunología reversa, seleccionaron aquellos segmentos aminoacídicos derivados de MC1R más probables de inducir respuesta citotóxica específica. Treinta y un péptidos derivados de MC1R fueron sintetizados y utilizados para probar la capacidad de unión a la molécula HLA-A2. De un grupo de 12 péptidos de alta e intermedia afinidad, sólo 3 fueron capaces de inducir respuesta en líneas de linfocitos T citotóxicos péptido-específicas. Los péptidos estudiados fueron: **MC1R244** (TILLGIFFL), **MC1R238** (FLALIICNA) y **MC1R291** (AIIDPLIYA). Los CTL fueron obtenidos de células mononucleares de sangre periférica de donantes normales HLA-A2 +, después de consecutivas estimulaciones *in vitro* con pulsos de estos péptidos asociados a células presentadoras de antígenos profesionales (Salazar-Onfray *et al* 1997).

Estos estudios abrieron la posibilidad de investigar otro aspecto relacionado con el potencial inmunoterapéutico de MC1R y que tiene que ver con su distribución tisular. Estudios de PCR, utilizando cDNA provenientes de distintos tejidos, han demostrado que MC1R está también presente en varios tejidos normales tales como cerebelo, glándula adrenal, monocitos, hígado, nódulos linfáticos, pituitaria, bazo, útero, testículo, ovario y placenta (Chhajlani *et al* 1993). En estos tres últimos órganos, mediante la técnica de inmunohistoquímica, se comprobó específicamente la presencia de este receptor en las células de Leydig, células del cuerpo lúteo y el núcleo de las células trofoblásticas de la placenta (Trörnwall *et al* 1997). La utilización de un anticuerpo específico capaz de unirse y detectar epitopos a través de ésta técnica, permitiría conocer la presencia, distribución y localización del receptor MC1R en diversos estadios de evolución del melanoma maligno, considerando lesiones cutáneas primarias, metástasis ganglionares regionales y metástasis a distancia, todo esto en comparación con tejido no neoplásico. La posible existencia de

diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de MC1R entre tejidos melanómicos y normales, podría permitir el uso de este antígeno en inmunoterapia.

HIPÓTESIS:

- El antígeno MC1R está sobre expresado en células de melanoma maligno en comparación con el tejido no neoplásico.
- MC1R se sobre expresa tanto en melanomas primarios como metastásicos, lo que permitiría utilizar este antígeno en futuros tratamientos inmunoterapéuticos.
- Es posible aislar clones derivados de líneas de linfocitos T citotóxicos específicos anti-péptidos de MC1R que reconozcan células tumorales de melanoma y células cargadas exógenamente con el péptido.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la distribución y las propiedades inmunes específicas del antígeno asociado a melanoma MC1R.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a través de análisis inmunohistoquímicos, la distribución del receptor MC1R en tejidos de melanoma ocular, cutáneo en estado primario, infiltrante y metastásico.
- Caracterizar la expresión de MC1R en líneas celulares de melanoma, en comparación con células de melanocitos cultivadas *in vitro*.
- Establecer clones CTL específicos para péptidos derivados de MC1R con restricción HLA-A2+ a partir de PBMC de donantes normales.

MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Análisis de inmunohistoquímica en cortes desparafinados:

El estudio fue realizado a partir de muestras de biopsias incluidas en bloques de parafina, provenientes de la Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se recolectaron un total de 4 muestras a saber: Nevo azul, metástasis regional ganglionar, metástasis intestinal y cerebral. Además del servicio de Oftalmología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile se obtuvieron muestras de melanoma ocular correspondientes a dos pacientes. Los cortes de 5 μm fueron desparafinados y rehidratados en escala descendiente de etanol hasta agua destilada. Aquellos cortes que poseían una intensa pigmentación fueron sometidos a un blanqueamiento de melanina en una solución de permanganato de potasio al 0.05% (SUDELAB, Santiago, Chile.) durante 1 a 2 horas y luego revelados en una solución de ácido oxálico al a 0.1% hasta que desapareciese el color.

La inmunohistoquímica se desarrolló utilizando el Kit Universal LSAB Peroxidase K683 (DAKO, Glostrup, Denmark.). Resumidamente, se bloqueó la actividad de la

peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min. Después de un lavado con PBS, los cortes fueron incubados con suero bloqueador de unión inespecífica de equino por 10 min. Sin lavar, las muestras se incubaron durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario MP1-1B7 (anti-MC1R) o con el anticuerpo anti-9.2.31 (anti-melanoma) gentilmente donados por el Dr. Vijay Chhajlani (Astra Hassle AB, Suecia) en una concentración de 10 µg/ml, o con un anticuerpo irrelevante HB104 (anti H-2K^d) para las muestras control.

Luego de 3 lavados con PBS de 5 min. cada uno, los cortes se incubaron durante 15 min., con anticuerpo monoclonal anti-Ig de ratón biotinilado. Se repitió el lavado y se aplicó el complejo estreptavidina-peroxidasa por otros 15 min. Después de un buen lavado se incubó el substrato AEC Chromogen por 5-15 min. La expresión de la proteína MC1R fue evaluada en un microscopio convencional, utilizando una escala arbitraria basada en la intensidad de la inmunoreactividad, mientras que las fotografías fueron obtenidas a través de un microscopio invertido adosado a un sistema digital de captura de imágenes, gentilmente facilitado por el Dr. José Manuel Ojeda (Virología, ICBM, U. de Chile.) que permitió el registro y presentación de resultados.

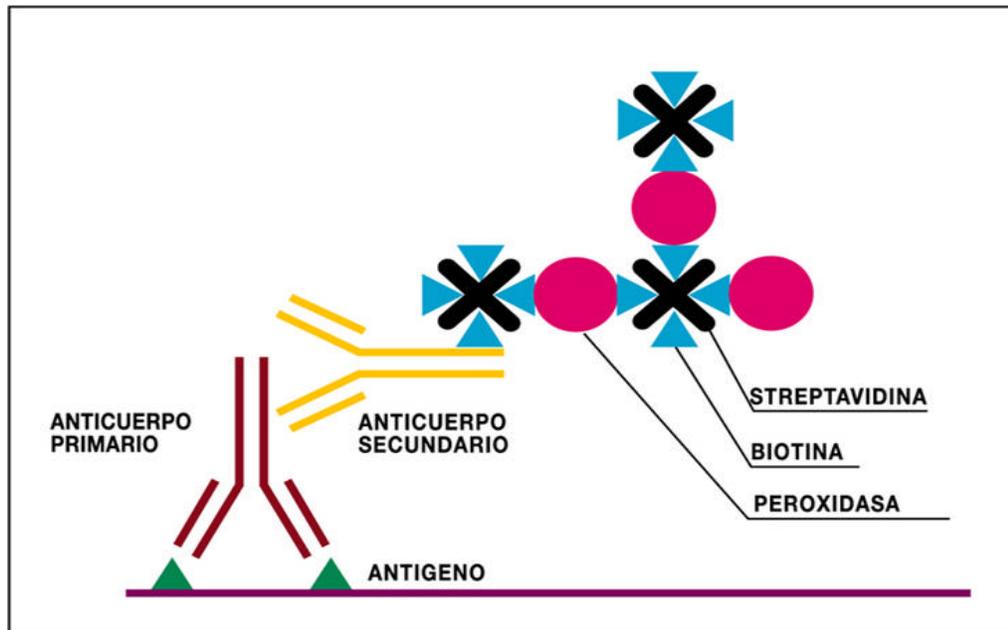


Figura 1: Diagrama que muestra la técnica de inmunohistoquímica. El antígeno MC1R es detectado por el anticuerpo primario de ratón MP1-1B7, al cual se le une el anticuerpo secundario biotinilado anti Ig de ratón. Mediante la molécula biotina se une el complejo streptavidina-peroxidasa, esta enzima es la que cataliza la transformación del cromógeno AEC en un compuesto coloreado insoluble que se deposita en el sector donde se encuentra el antígeno

2. Cultivos celulares:

Las líneas de melanoma FMS, FM55 y 397, además de los melanomas oculares OMC1 y OMC3, fueron establecidas por el Dr. Flavio Salazar en el Instituto Karolinska. Ellas derivan de lesiones metastásicas de pacientes con melanoma tratados en el Radiumhemmet, Hospital Karolinska. Las líneas T2, una línea celular TAP mutante y C1R-A2, una línea deficiente para la expresión de MHC clase I y transfectadas con HLA-A2, fueron utilizadas como células blanco cargadas de péptidos exógenos en ensayos de liberación de ^{51}Cr como ha sido descrito (Salazar-Onfray et al 1997). Las células fueron mantenidas a 37°C y alimentadas 2 a 3 veces por semana en medio RPMI 1640 (GIBCO

BRL, Gaithersburg, NY, USA.) suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (FBS), 1% L-glutamina (GIBCO BRL, Gaithersburg, NY, USA.) y 1% Penicilina-estreptomicina (SIGMA, St. Louis, USA.).

3. Inmunocitoquímica para cultivos celulares:

Se utilizaron células de melanoma y melanocitos (Si2-II), facilitados por la Dra. Luz María Muñoz (Virología, ICBM, U. de Chile.), las que fueron sembradas en portaobjetos estériles. Al lograr la adherencia propia de estas células, las preparaciones fueron lavadas en PBS y fijadas en metanol 100% frío a 4°C por 10 min. para iniciar la tinción inmunoespecífica descrita anteriormente.

4. Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC):

Concentrados leucocitarios de donantes normales (buffy coat) de 50 ml, donados por el Banco de Sangre del Hospital San José, fueron mezclados con 40 ml de PBS estéril. Cada muestra fue separada en tres tubos cónicos de 50 ml que contenían 10 ml de Lymphoprep® (NYCOMED PHARMA, Oslo, Norway.) y centrifugada durante 20 minutos a 1200 r.p.m. sin freno con una temperatura de 4°C utilizando una centrifuga refrigerada IEC modelo MP4R (MA, USA). Después se transfirió la banda de mononucleares con pipeta Pasteur a tubos cónicos y se lavó tres veces con un volumen de 20 ml de PBS durante 4 min. a 1400 r.p.m., resuspendiéndose en un volumen final de 15 ml para su cuantificación y determinación de viabilidad por exclusión con Azul tripano.

5. Preparación de Dynabeads®:

Para la técnica de tipificación y de separación celular se utilizaron partículas de hierro Dynabeads® (DYNAL, Oslo, Norway.) que están acopladas a anticuerpos específicos contra inmunoglobulinas de ratón permitiendo su acoplamiento a anticuerpos generados en ratón de amplias especificidades. Se prepararon 1×10^7 partículas para $2 \mu\text{g}$ de anticuerpo secundario incubando 30 min. a 4°C , para luego lavar 3 veces en tampón PBS 0.1% BSA utilizando el concentrador magnético de partículas (DYNAL, Oslo, Norway.)

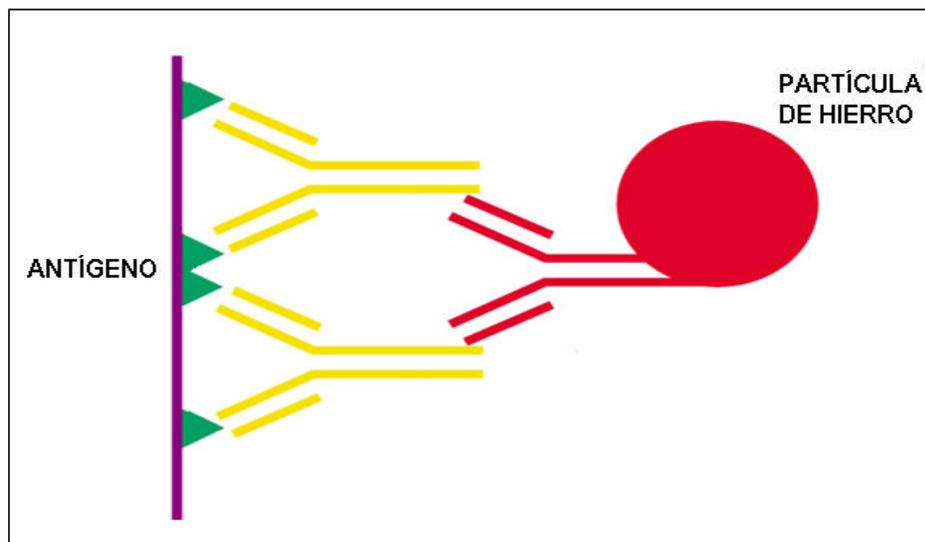


Figura 2: Diagrama que muestra la preparación de Dynabeads®. La partícula de hierro (bead) está conjugada con un anticuerpo de cabra (rojo) anti fragmento FC de Ig de ratón, el cual se une al anticuerpo monoclonal de interés, (amarillo) esto permitió la separación y tipificación de varias poblaciones celulares según uno de los antígenos de superficie.

6. Tipificación de antígeno HLA-A2:

Se incubó $15 \mu\text{l}$ de la suspensión celular de mononucleares con $5 \mu\text{l}$ de Dynabeads® conjugados con anticuerpos de ratón anti HLA-A2 en tubos de ensayo durante 10 minutos.

Se aplicaron 10 μ l de esta solución en cámaras de Bürker. Bajo el microscopio las muestras positivas presentaron rosetas formadas por las partículas de hierro. Las células HLA-A2 positivas fueron utilizadas para la inducción y estimulación de células CTL péptido específicas, mientras que las células HLA-A2 negativas se destinaron para la producción de células de sustento utilizadas en el cultivo de linfocitos.

7. *Irradiación de células:*

Las células HLA-A2 negativas en suspensión y DC cargadas con péptidos fueron irradiadas, para evitar su proliferación, con una dosis de 25 RAD bajo una fuente de ^{60}Co en el reactor de la Comisión Chilena de Energía Nuclear de La Reina.

8. *Inactivación celular por Mitomicina C:*

Para evitar la proliferación de células presentadoras de péptidos o para la preparación de células de sustento, se utilizó Mitomicina C, aplicada en una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para 1 a 1.5×10^6 células/ml, incubando 45 min. a 37°C. Después se realizaron 3 lavados con medio RPMI 10% FBS.

9. *Preparación de células de sustento:*

La suspensión celular de sustento se utiliza como un medio que ofrece condiciones óptimas para la sobrevivencia y proliferación de bajas cantidades de líneas y clones CTL. Consiste en 1.5×10^6 de PBMC HLA-A2 negativas irradiadas /ml de medio provenientes de dos donantes distintos, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de fitohematoglutinina (PHA) y 50 unidades/ml de IL-2, todo en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS).

10. Descongelación de células:

Células establecidas por el Dr Flavio Salazar, mantenidas en crioviales en nitrógeno líquido, fueron descongeladas en agua a 37°C. Rápidamente el contenido de los crioviales fue lavado 3 veces en 2,5 ml de RPMI %5 FBS, centrifugando a 1200 r.p.m. por 3 min. La concentración final de células en la siembra fue de 1 a 1.5×10^6 céls/ml aproximadamente.

11. Producción de líneas CTL péptido-específicas

El procedimiento seguido fue de acuerdo al protocolo EUCAPS para la generación de CTL específicas anti-péptido a partir de PBMC frescas de donantes normales.

- *Cultivo de células estimuladoras (DC):*

Día -7: Fueron plaqueadas 20×10^6 PBMC contenidas en 3 ml de RPMI 10% FBS, por recipiente, en placas de cultivo de 6 pocillos. Se incubó por 2 horas a 37°C, al finalizar se agitó suavemente la placa y se recolectó el medio que contenía las células no adherentes. Se lavaron los pocillos con 2 ml RPMI 10% SFB para remover el resto de células no adherentes. Éstas fueron congeladas y utilizadas posteriormente como células respondedoras. Luego se agregó 2.5 ml de RPMI 10% SFB que contenía 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4 a cada pocillo, iniciándose así la diferenciación de monocitos a células dendríticas. Las PBMC que no fueron utilizadas fueron congeladas y utilizadas más tarde.

Día -5: Se agregó 2.5 ml de RPMI 10% SFB suplementado con 1600 U/ml de GM-SCF y 1000 U/ml de IL-4.

Día -3: Fueron restituidos 2.5 ml de RPMI 10% SFB por otros que contenían 1600 U/ml de GM-SCF y 1000 U/ml de IL-4.

Día -1: Un ml de medio fue reemplazado por 1 ml de RPMI 10% SFB que contenía 10 ng/ml de TNF- α . De ésta forma se induce el desarrollo de células dendríticas a un estado maduro.

Día 0: Fueron cosechadas las DC cultivadas. Se lavó dos veces en RPMI 10% SFB. Se resuspendió en 1 ml de medio que contenía 20 μ g/ml de péptido, de esta forma se cargan las DC con péptidos sintéticos al incubarse a 26°C por 4 horas agitando suavemente cada hora, para luego irradiar a 25 RAD y realizar 2 lavados con medio, quedando en una concentración final de 0.3×10^6 /ml en RPMI 10% SFB.

- *Estímulo de CTL:* Fue descongelada la fracción de células respondedoras no adherentes del día -7 y resuspendidas en una concentración de 3×10^6 cels/ml. Se utilizó una razón de 10 células respondedoras por 1 célula estimuladora. Fueron mezcladas y cultivadas en placas de 24 pocillos con un volumen final de 1 ml de medio RPMI 10% SFB que contenía 20 ng/ml de IL-7 y 100 pg/ml de IL-12.

Día 7: Un ml de medio fue reemplazado con 1 ml de que contenía 20 ng/ml de IL-7.

Día 12: PBMC autólogo provenientes del día -7 se descongelaron e irradiaron a 25 RAD fue lavado y resuspendido en una concentración final de 4×10^6 cels/ml sembradas en placa de 24 pocillos en 1 ml e incubadas por 2 horas a 37°C. Luego se agitó la placa y se colectó el medio lavando suavemente descartando así las células no adherentes. Se agregó 0.5 ml de medio RPMI 10% SFB conteniendo 20 μ g/ml de péptido MCIR 291 a las células adherentes incubando por 2 horas a 37°C. Finalmente se removió el medio y se agregó 1 ml de suspensión de células respondedoras (1.5×10^6 cels/ml) que habían sido colectadas, separadas por Lymphoprep®, lavadas y contadas.

Día 14: Fue agregado 1 ml de RPMI 10% SFB que contenía 20 U/ml de IL-2 a cada pocillo.

Día 19: Se reestimuló como en el día 12.

Día 21: Fue agregado medio con IL-2 como en el día 14.

Día 26: Se reestimuló como en el día 12 y bajo el microscopio se evaluó la razón de poblaciones CD8/CD4, al tomar una alícuota de 15µl del cultivo e incubando con 5µl anticuerpo anti CD8 o CD4 conjugados con Dynabeads®

Día 28: Fue agregado medio con IL-2 como en el día 14.

Día 33: Las células respondedoras fueron colectadas y se realizó la separación de linfocitos CD8/CD4.

12. Separación de células CD8/CD4:

La suspensión de linfocitos fue colectada con una concentración de 2.5×10^6 cels/ml. Se utilizaron aproximadamente 1×10^7 partículas Dynabeads® para la selección positiva (25 µl), es decir una razón aproximada de 4 partículas por célula. La preparación de anticuerpo primario-Dynabeads® se incubó por 20 min. a 4°C con agitación. Utilizando el concentrador magnético de partículas (DYNAL, Oslo, Norway.) se realizaron 3 lavados con PBS 0.1% BSA, y se sembraron en placas de cultivo en medio RPMI 10% FSB más 20 U/ml IL-2.

13. Citometría de flujo:

Para detectar marcadores celulares de membrana se fijaron 1.5×10^5 células con 0.5 % formaldehído en PBS durante 10 min a 37°C. Después de un lavado con PBS, se colocaron 50 μ l de medio RPMI que contenían los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC o PE (PHARMINGEN, San Diego, CA, USA.) en una concentración de 1-2 μ g/ml. También se preparó el mismo volumen de medio sin anticuerpo como control negativo. La incubación fue de 30 min a 4°C. Se almacenó en 100 μ l de PBS azida con 1% formaldehído, y a 4°C en un tubo bien cerrado protegido de la luz hasta su lectura en citómetro de flujo FACscan (BECTON DICKINSON, San Diego, CA, USA.) en la Unidad de Inmunología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

14. Ensayo de liberación de ^{51}Cr :

Para analizar el reconocimiento de los antígenos por los CTL se tomaron 5×10^5 células C1R-A2 contenidas en 0.5 ml, las cuales fueron cargadas con el péptido MCIR 291 (10 μ g/ml) a 26°C por 2 horas. Estas células, en conjunto con las líneas de melanoma FMS y OMC1 y OMC3, se marcaron con 25 μ l de ^{51}Cr (10 μ Cu/ml) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se utilizaron 2 relaciones de células efectoras y células blanco (E:T ratio) 10:1 y 25:1, las que fueron incubadas por 6 hrs. a 37°. Se incluyeron pruebas de emisión espontánea y máxima. La línea celular K562, sensible a la actividad NK, fue utilizada como control de especificidad. Los sobrenadantes fueron recolectados y su radioactividad se determinó usando un contador de radiación gamma PACKARD modelo Cobra . El porcentaje de lisis se calculó de acuerdo a la siguiente formula: % = 100 x ((liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea.)

RESULTADOS:

1. Inmunohistoquímica de tejidos de melanoma:

Utilizando el anticuerpo monoclonal MP1-1B7 (anti-MC1R) en cortes en parafina obtenidos de biopsias de tejidos melanómicos, se observó una sobre expresión de MC1R en melanoma maligno de origen cutáneo, como también en melanoma ocular, en comparación con la presencia de este antígeno en nevus benignos. (Tabla 1). Además se pudo apreciar una baja expresión de la proteína en queratinocitos normales. (Fig. 3). Importante resulta la expresión de MC1R en diversas metástasis, en niveles comparables a los melanomas primarios (Tabla 1, Fig. 3). El anticuerpo monoclonal 9.2.27, específico para melanoma, corroboró el origen melanómico de los tejidos correspondientes (datos no incluidos).

Tabla 1: Expresión del antígeno MC1R en cortes de tejido medida por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal MP1-1B7 como se describe en material y métodos.

Tejido	Intensidad de Tinción
Nevo Azul	-
Melanoma Primario Cutáneo	+++
Metástasis ganglionar	+++
Metástasis Maxilar	+++
Metástasis Cerebral	+++
Metástasis Intestinal	+++
Melanoma Ocular 1	++
Melanoma Ocular 2	+++

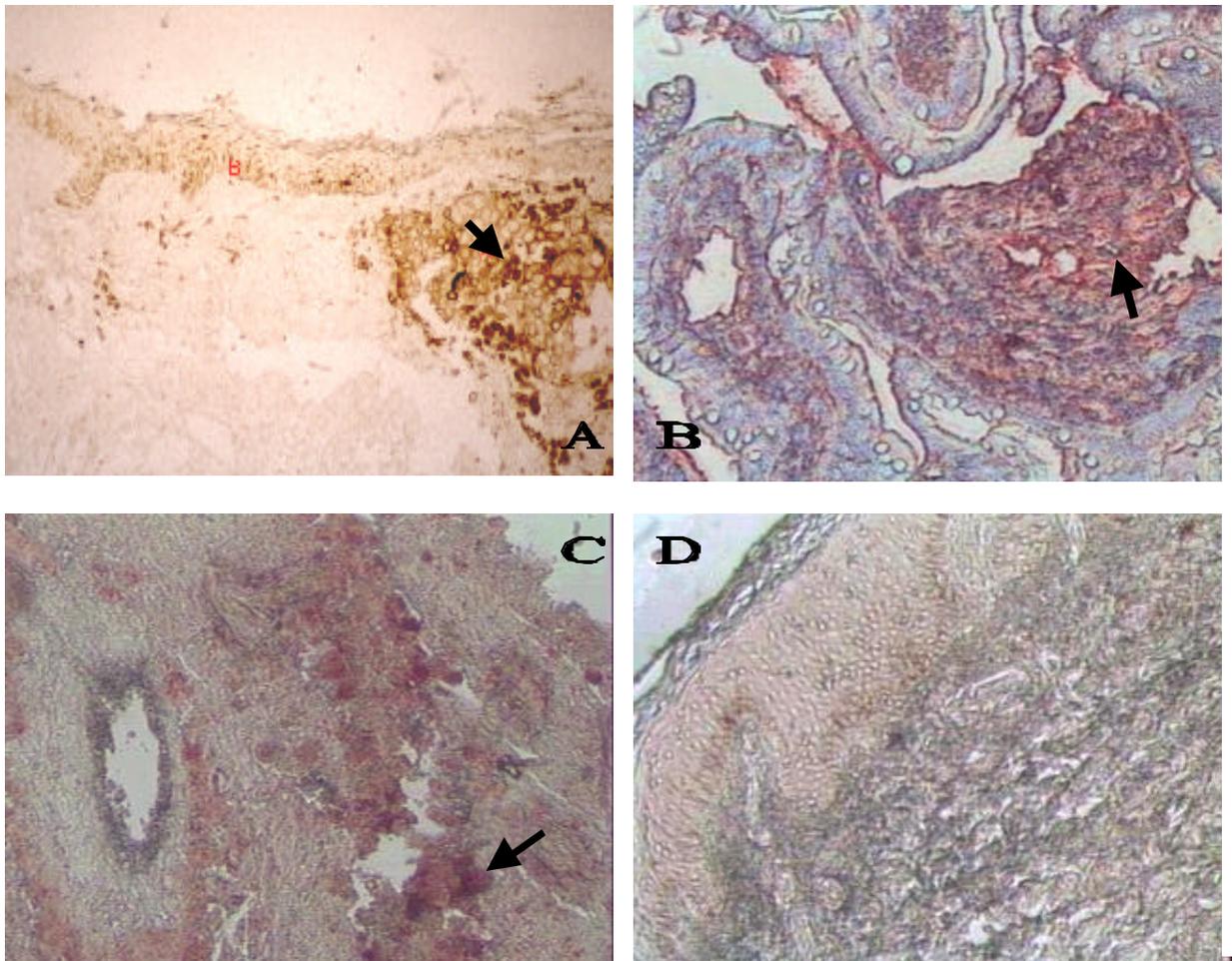


Figura 3: Localización del antígeno MC1R en: A) melanoma cutáneo primario 5x, B) Metástasis intestinal 10x, C) Melanoma uveal 10x y D) Nevo azul 10x, utilizando el anticuerpo MP1-1B7 (anti-MC1R) como se describe en material y métodos.

2. Inmunocitoquímica en Líneas Celulares:

La técnica inmunocitoquímica reveló una fuerte expresión de MC1R en la totalidad de las líneas de melanomas analizadas (n=4), incluyendo a las de origen uveal (n=2) (Tabla 2). También se detectó el antígeno en cultivos de melanocitos normales aunque con niveles de expresión menores a los detectados en melanoma (Fig. 4). No se detectó la presencia de MC1R en líneas celulares no melanómicas.

Tabla 2: Expresión del antígeno MC1R en líneas de melanoma mediante inmunohistoquímica por el anticuerpo monoclonal MP1-1B7 como se describe en materiales y métodos

Línea Celular	Intensidad de la Tinción
Melanocitos Si2-II	+
Melanoma FMS	+++
Melanoma FM 55	+++
Melanoma Ocular OMC-1	+++
Melanoma Ocular OMC-3	+++
Control COS-7	-

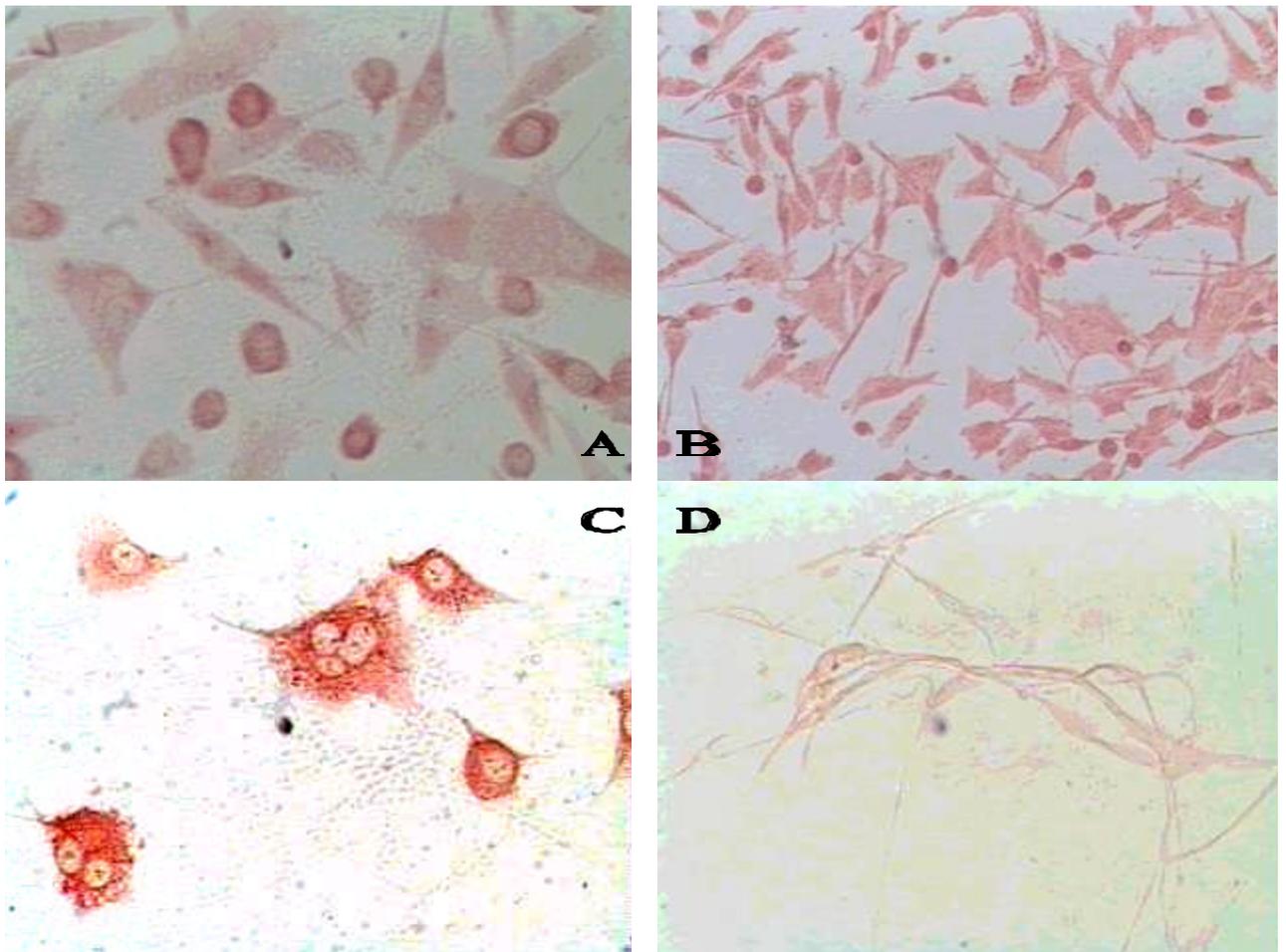


Figura 4: Localización del antígeno MC1R en: A) Línea de melanoma FM 55 40x, B) Línea de Melanoma FMS 10x, C) Línea de Melanoma ocular OMC3 40x y D) Melanocitos Si2-II 40x, utilizando el anticuerpo MP1-1B7 (anti-MC1R) como se describe en material y métodos.

3. Separación de linfocitos T citotóxicos:

Sangre periférica de un donante normal (P58) fue estimulada tres veces con células presentadoras autólogas cargadas con el péptido MC1R 291. Después de la tercera restimulación, los linfocitos del donante P58 fueron marcados con anticuerpos conjugados con fluorocromos. Se evaluó la razón CD8/CD4 lo que indicó que del total de la población de células, un 41% correspondió a linfocitos CD8+. Fue por ello necesario realizar un enriquecimiento de células citotóxicas, mediante el uso de Dynabeads® acoplados a anticuerpos anti-CD8. Mas tarde fue corroborada la eficacia de la separación celular mediante un estudio de Citometría de flujo (Fig 5). En este estudio se comprobó que se había logrado enriquecer la población de linfocitos CD8+ a un 91% del total.

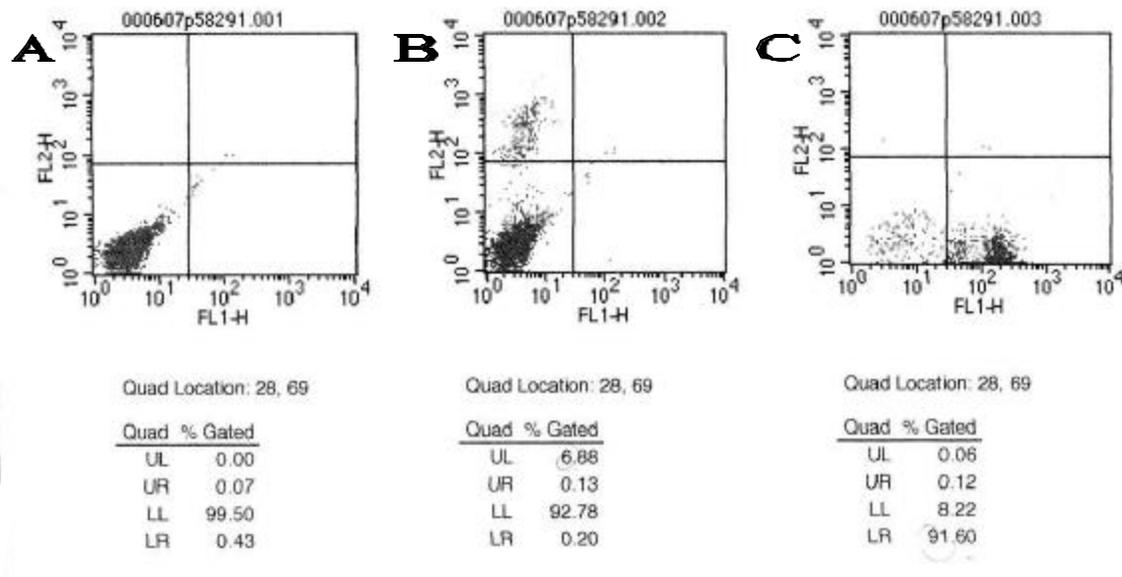


Fig 5: Citometría de flujo para detección de poblaciones de linfocitos CD8/CD4. A) Células sin anticuerpos B) Células conjugadas sólo con AcMo anti CD4 conjugado con PE C) Células conjugadas sólo con AcMo anti CD8 conjugado con FITC.

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A
MELANOMA DERIVADOS DEL RECEPTOR
MELANOCORTINA 1 (MC1R).**

**TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO
MENCIÓN MORFOFISIOPATOLOGÍA Y CITODIAGNÓSTICO**

Autor: Antonio Enrique Serrano Gómez

Director: Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray.

2000

A mi mamá

Trabajo realizado en el Laboratorio Central del Programa de Inmunología, del
Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios

A Flavio por su enseñanza de altísimo nivel en mis primeros pasos en la ciencia

A Meche por sus consejos y sobretodo por su amistad.

*A Alejo, Mónica y Adam, por ser más que compañeros de laboratorio, un grupo de
verdaderos amigos*

*A todos aquellos alumnos que una vez iniciaron este camino y que compartieron los
momentos más difíciles y las sonrisas más alegres.*

Gracias

INDICE:

	<i>página</i>
ABREVIATURAS:	6
RESUMEN:	7
INTRODUCCIÓN:	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	16
MATERIAL Y MÉTODOS:	17
RESULTADOS:	26
DISCUSIÓN:	33
CONCLUSIONES:	37
BIBLIOGRAFÍA:	38

ABREVIATURAS:

ACTH:	Hormona adenocorticotrópica
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico.
APC:	Célula presentadora de antígeno
CTL:	Linfocitos T citotóxicos
DC:	Célula dendrítica
HLA:	Antígeno leucocítico humano
IFN:	Interferón
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos.
IL:	Interleuquina
MCRs:	Receptores melanocortínicos
MC1R:	Receptor melanocortina 1
MHC:	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
NK:	Células agresoras naturales
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
POMC:	Molécula precursora propiomelanocortínica.
TCR:	Receptor célula T
TAP	Proteína asociada a transporte de antígenos
TIL:	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF:	Factor de Necrosis Tumoral
MSH:	Hormona melanocítica estimulante.

RESUMEN:

El creciente interés por una posible inmunoterapia contra el melanoma maligno ha incrementado la investigación acerca de los antígenos asociados a tumor que puedan ser reconocidos por células citotóxicas específicas. Pertenece a este grupo de antígenos, el ligando natural de la hormona α -MSH, el Receptor Melanocortina 1 (MC1R), del cual se describe actividad inmunoespecífica contra péptidos derivados de éste y presentados en el contexto de MHC clase I en pacientes con melanoma.

Con el fin de aumentar el conocimiento de las características del antígeno asociado a melanoma MC1R, se planteó caracterizar su distribución en tejidos melanómicos y normales humanos y sus propiedades inmunoespecíficas.

Se determinó que existe una importante expresión de la proteína MC1R en tejidos de melanoma primario cutáneo, metástasis linfática, metástasis a distancia y neoplasias de origen uveal, como también en células de melanoma cultivadas *in vitro*. MC1R pudo también ser detectado en células normales como los queratinocitos y los melanocitos, pero los niveles de expresión son significativamente menores a los observados en melanoma.

No fue posible obtener linfocitos citotóxicos inducidos al reconocimiento peptídico que pudiesen reconocer a péptidos derivados de MC1R y a células de melanoma, probablemente causado por una pérdida de la especificidad del cultivo CTL por apoptosis de linfocitos sobre-estimulados por citoquinas como IL-2, fenómeno comúnmente observado *in vitro*.

INTRODUCCIÓN:

1. *Melanoma:*

A pesar de los importantes avances de la medicina en la lucha contra el cáncer, se ha registrado un espectacular aumento en la incidencia del melanoma maligno a escala mundial en los últimos cuarenta años. Esta incidencia estaría relacionada a la sobre exposición de las personas a la luz solar, en especial a los rayos ultravioleta B y a la disminución concomitante de la capa de ozono (Woodhead *et al* 1999). Otros factores importantes en relación con melanoma, lo constituyen los antecedentes genéticos e inmunológicos, la exposición a carcinógenos y la preexistencia de nevus comunes. El melanoma puede afectar a adultos y personas jóvenes, siendo una importante causa de muerte en países desarrollados (Fauci *et al* 1998).

Los melanomas se originan a partir de la transformación maligna de los melanocitos, células derivadas de la cresta neural. Pueden aparecer en cualquier lugar de la piel y mucosas, como también en la uvea e iris. Histológicamente pueden describirse varios tipos de ellos, de acuerdo a su nivel diferencial de pigmentación (Cotran *et al* 1995). Considerando su evolución natural, los melanomas atraviesan la membrana basal del epitelio y se trasladan a través de los vasos linfáticos a ganglios regionales y por diseminación hematológica colonizan con mayor frecuencia hígado, pulmón, tracto gastrointestinal, hueso o sistema nervioso central (Rosai 1996). Los melanomas además pueden expandirse localmente, fenómeno que se conoce como metástasis satélite. Mención especial merece el melanoma derivado de úvea, ya que es la neoplasia intraocular más común en el adulto y sus metástasis tienen como destino preferencial el tejido hepático (Albert *et al* 1992).

El tratamiento que dispone la medicina en la actualidad se basa en primera instancia

en la erradicación del tumor mediante cirugía, donde la extirpación local de lesiones cutáneas de pequeño tamaño y que no traspasan la membrana basal del epitelio da buenos resultados.

Cuando las células tumorales han superado esta barrera y se diseminan producen las llamadas metástasis. Las células neoplásicas, a diferencia de las normales, entran en un estado de constante y descontrolada proliferación. Es esta característica de división activa, la que es aprovechada utilizando la radio y quimioterapia que apuntan a la destrucción celular atacando el DNA durante la mitosis (Palomo et al 1998).

Aún cuando se han experimentado grandes avances relacionados a estas terapias en otros tipos de cáncer, los resultados de los tratamientos tradicionales en la enfermedad metastásica de melanoma son decepcionantes, lo que hace imprescindible la utilización de tratamientos alternativos basados en el diagnóstico precoz y el desarrollo de nuevas estrategias para tratar la enfermedad. Una de ellas es la inmunoterapia del cáncer, la cual trata de inducir respuestas del sistema inmune contra los tumores malignos (Fauci *et al* 1998).

2. *Inmunología anti-tumoral:*

A comienzos del siglo XX los experimentos de Paul Ehrlich cimentaron las bases de lo que más tarde se conocería como inmunidad anti-tumoral. En aquellas experiencias se observó que los tumores que eran trasplantados de un animal de experimentación a otro sano solían involucionar en este último. Tiempo después, estas observaciones cayeron en el descrédito al conocerse los mecanismos inmunológicos de rechazo a tejidos trasplantados. Sin embargo, la obtención de ratones singénicos en década de los 50, y los resultados experimentales de regresión de tumores obtenidos con estas cepas, permiten a Sir

McFarlane Burnet y Lewis Thomas proponer en la década del 70 la teoría de la inmunovigilancia anti-tumoral. Esta teoría postula que una de las principales funciones del sistema inmune sería la de mantener al organismo libre de microorganismos patógenos y de células neoplásicas (Burnett 1970).

Los mecanismos inmunológicos que se ponen en juego contra los tumores son variados, entre los cuales existen elementos de la respuesta innata, como las células NK y los macrófagos, de la respuesta mediada por los anticuerpos, y principalmente de la inmunidad celular mediada por los linfocitos T, especialmente los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) (Stites *et al* 1994).

En la actualidad la inmunología anti-tumoral engloba el estudio de: las respuestas inmunes adquiridas frente a los tumores, la identificación de los antígenos de las células tumorales que inducen respuesta, los mecanismos efectoros y los métodos de prevención inmunológica e inmunoterapia del cáncer. La profundización en el estudio de esta disciplina ha permitido desarrollar estrategias de inmunoterapia anti-tumoral, que incluyen la estimulación no específica del sistema inmune mediante coadyuvantes o citoquinas, la terapia pasiva con anticuerpos anti-tumorales y la inmunización activa contra tumores a través de la transfección de células tumorales con genes de citoquinas o de moléculas coestimuladoras para elevar su inmunogenicidad. Otras estrategias son el tratamiento celular adoptivo de transferencia de células efectoras con reactividad anti-tumoral activadas *in vitro*, las llamadas LAK, o el tratamiento con linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) (Fernández *et al* 1998).

3. *Mecanismos de escape tumoral:*

Individuos inmunocompetentes desarrollan neoplasias mortales, por lo que la acción del sistema inmune es probablemente modulada por características propias de las células malignas. Se han identificado tumores que poseen la capacidad de secretar citoquinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) o la interleuquina 10 (IL-10) (Salazar-Onfray 1999). Otras células tumorales pueden perder estructuras fundamentales para el reconocimiento antigénico, como las moléculas principales de histocompatibilidad (MHC) (Hurks *et al* 2000). Otras formas de evadir el sistema inmune lo constituyen la pérdida, por parte del tumor, de moléculas de adhesión requeridas por los linfocitos para activarse, la adquisición de estructuras que aumentan sus posibilidades metastásicas, la expresión de moléculas homólogas a proteínas de regulación del complemento y la secreción de mediadores que inducen apoptosis en células inflamatorias (Geertsen *et al* 1999).

Es por ello que un importante objetivo de la investigación oncológica actual es el desarrollo de formas de aumentar las respuestas inmunes del huésped frente a los tumores y evitar los mecanismos de escape mediados por el tumor.

4. Antígenos tumorales:

La transformación maligna de tejidos propios normales está asociada a la expresión de moléculas en la superficie de las células tumorales que pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune específico. Los llamados antígenos tumorales son dianas capaces de inducir respuestas dirigidas contra las células neoplásicas que los expresan. De hecho, varias observaciones clínicas y experimentales sugieren que los tumores pueden estimular respuestas inmunes en sus huéspedes. (Abbas *et al* 2000).

Los antígenos tumorales de mayor relevancia en la actualidad son aquellos que son reconocidos por los linfocitos T CD8+. Los CTL son células que a través de su molécula TCR reconocen péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos en el contexto de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase I. Estos péptidos derivan de proteínas, principalmente endógenas, las que son procesadas intracelularmente en la mayoría de las células nucleadas del organismo. El MHC clase I es una glicoproteína de transmembrana de 44 kD con 3 dominios alfa ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) unida de forma no covalente a un polipéptido de 12 kD no polimórfico llamado microglobulina $\beta 2$. Los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ forman un bolsillo en el cual se presenta el péptido procesado. El gen que codifica para esta molécula en humanos se denomina HLA, es altamente polimórfico y destacan los alelos HLA-A1 y HLA-A2 expresados en el 25-30% y 45-55% de los individuos caucásicos, respectivamente. Es por esta razón que éstos son los alelos más estudiados en la investigación oncológica (Fauci 1998).

Los antígenos tumorales derivan de una gran variedad de proteínas las que según su origen y características pueden ser agrupados en: antígenos oncofetales, antígenos tejido-específicos, antígenos derivados de proteínas con mutaciones puntuales y de genes silentes, antígenos derivados de proteínas oncogénicas y antígenos derivados de proteínas virales relacionados a ciertas neoplasias (Roitt *et al* 1998). Estos antígenos han sido identificados mediante métodos bioquímicos genéticos o de inmunología reversa. Este último consiste en predecir péptidos afines a determinadas moléculas HLA, que deriven de proteínas caracterizadas de tumor, a través de un análisis por ordenador, y que pueden servir como antígenos asociados a tumor (Gulukota *et al* 1997).

En melanoma existen muchos datos que sugieren que esta neoplasia es susceptible

al reconocimiento por las células citotóxicas. Avalan estas evidencias, el hecho de que histológicamente se observan infiltrados mononucleares de LT, NK e hiperplasia en los ganglios linfáticos regionales. Las correlaciones histopatológicas muestran que la presencia de infiltrados linfocíticos en el melanoma se asocia a un mejor pronóstico en comparación con aquellos tumores con un infiltrado linfocitario T menor (Abbas *et al* 2000). Los CTL realizan sus funciones efectoras lisando la célula blanco vía gránulos citolíticos, lo que termina con la inducción de la apoptosis.

Los principales antígenos asociados a melanomas expresados en la superficie celular asociados a MHC, se involucran en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, control de la pigmentación y calidad de la melanina (Castelli *et al* 2000).

Se han identificado antígenos derivados de proteínas melanosomales como Melan-A/Mart-1, MAGE 1, 2 y 3, gp-100, gp75, TRP-2 y tirosinasa (Coulie *et al* 1994, Kawakami *et al* 1994a, Kawakami *et al* 1994b Brichard *et al* 1993 y Wofel *et al* 1994). La existencia de CTL específicos contra estos antígenos en los pacientes con melanoma, podría deberse a una sobre expresión de estas proteínas en las células cancerosas con respecto al tejido normal, lo que gatillaría la respuesta inmune.

En los últimos años varios grupos de investigadores han centrado sus estudios en describir nuevos antígenos tumorales asociados a melanoma, con la perspectiva de desarrollar inmunoterapias efectivas. Un antígeno recientemente clonado es el Receptor Melanocortina 1 (MC1R) (Salazar-Onfray *et al* 1997).

5. *Receptor Melanocortina 1 (MC1R):*

MC1R es una proteína de 35 kD, que consta de 7 dominios transmembránicos

(Tatro *et al* 1990), y pertenece a una nueva familia de receptores melanocortínicos, en donde cinco diferentes genes codifican para distintos MCRs (Chhajlani & Wikberg 1992). Se encuentra localizado tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma y su síntesis es inducible (Chakraborty *et al* 1991). El MC1R es altamente afín a su ligando natural, la Hormona Melanocítica Estimulante α (α -MSH). Esta hormona es un tridecapéptido litocorticotropo secretado por la *pars intermedia* de la hipófisis (Pumarino 1984), que deriva de la molécula precursora propiomelanocortínica POMC. De acuerdo con la estructura primaria, el POMC está íntimamente relacionado con la hormona adenocorticotrópica ACTH, incluso ésta tiene leve actividad melanocítica estimulante, pero es completamente diferente de otras hormonas derivadas de POMC como β -MSH, γ -MSH y β endorfina (Eberle 1998).

La unión de α -MSH activa la proteína G (Frandsberg *et al* 1998) e incrementa la acumulación de cAMP y de calcio citosólico (McNeil *et al* 1990), activando la proteína quinasa C (Buffey *et al* 1991). Todo esto provoca que los melanocitos, presentes en abundancia entre la dermis y la epidermis, formen el pigmento melanina y lo dispersen por la piel (Guyton & Hall 1998, Suzuki *et al* 1996). Otros datos sugieren que en melanoma, la presencia de MC1R es altamente variable postulándose que los receptores de MSH fluctúan en el ciclo de las células del tumor (Xia *et al* 1996).

Se ha acumulado evidencia que indica que el neuropéptido α -MSH, siendo una hormona pigmentaria, también jugaría un rol crucial en la regulación de las respuestas inmunes (Bhardwaj *et al* 1997). La MSH- α funciona como un antagonista de las citoquinas pro-inflamatorias, inhibiendo la actividad de IL-1 β , IL-6 y TNF, bloqueando la síntesis de IFN- γ (Robertson *et al* 1988, Hiltz *et al* 1992) e incrementando la producción de citoquinas

inmunosupresoras como IL-10 en monocitos humanos (Bhardwaj *et al* 1996).

Salazar-Onfray y cols, utilizando el método de inmunología reversa, seleccionaron aquellos segmentos aminoacídicos derivados de MC1R más probables de inducir respuesta citotóxica específica. Treinta y un péptidos derivados de MC1R fueron sintetizados y utilizados para probar la capacidad de unión a la molécula HLA-A2. De un grupo de 12 péptidos de alta e intermedia afinidad, sólo 3 fueron capaces de inducir respuesta en líneas de linfocitos T citotóxicos péptido-específicas. Los péptidos estudiados fueron: **MC1R244** (TILLGIFFL), **MC1R238** (FLALIICNA) y **MC1R291** (AIIDPLIYA). Los CTL fueron obtenidos de células mononucleares de sangre periférica de donantes normales HLA-A2 +, después de consecutivas estimulaciones *in vitro* con pulsos de estos péptidos asociados a células presentadoras de antígenos profesionales (Salazar-Onfray *et al* 1997).

Estos estudios abrieron la posibilidad de investigar otro aspecto relacionado con el potencial inmunoterapéutico de MC1R y que tiene que ver con su distribución tisular. Estudios de PCR, utilizando cDNA provenientes de distintos tejidos, han demostrado que MC1R está también presente en varios tejidos normales tales como cerebelo, glándula adrenal, monocitos, hígado, nódulos linfáticos, pituitaria, bazo, útero, testículo, ovario y placenta (Chhajlani *et al* 1993). En estos tres últimos órganos, mediante la técnica de inmunohistoquímica, se comprobó específicamente la presencia de este receptor en las células de Leydig, células del cuerpo lúteo y el núcleo de las células trofoblásticas de la placenta (Trörnwall *et al* 1997). La utilización de un anticuerpo específico capaz de unirse y detectar epitopos a través de ésta técnica, permitiría conocer la presencia, distribución y localización del receptor MC1R en diversos estadios de evolución del melanoma maligno, considerando lesiones cutáneas primarias, metástasis ganglionares regionales y metástasis a distancia, todo esto en comparación con tejido no neoplásico. La posible existencia de

diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de MC1R entre tejidos melanómicos y normales, podría permitir el uso de este antígeno en inmunoterapia.

HIPÓTESIS:

- El antígeno MC1R está sobre expresado en células de melanoma maligno en comparación con el tejido no neoplásico.
- MC1R se sobre expresa tanto en melanomas primarios como metastásicos, lo que permitiría utilizar este antígeno en futuros tratamientos inmunoterapéuticos.
- Es posible aislar clones derivados de líneas de linfocitos T citotóxicos específicos anti-péptidos de MC1R que reconozcan células tumorales de melanoma y células cargadas exógenamente con el péptido.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la distribución y las propiedades inmunes específicas del antígeno asociado a melanoma MC1R.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a través de análisis inmunohistoquímicos, la distribución del receptor MC1R en tejidos de melanoma ocular, cutáneo en estado primario, infiltrante y metastásico.
- Caracterizar la expresión de MC1R en líneas celulares de melanoma, en comparación con células de melanocitos cultivadas *in vitro*.
- Establecer clones CTL específicos para péptidos derivados de MC1R con restricción HLA-A2+ a partir de PBMC de donantes normales.

MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Análisis de inmunohistoquímica en cortes desparafinados:

El estudio fue realizado a partir de muestras de biopsias incluidas en bloques de parafina, provenientes de la Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se recolectaron un total de 4 muestras a saber: Nevo azul, metástasis regional ganglionar, metástasis intestinal y cerebral. Además del servicio de Oftalmología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile se obtuvieron muestras de melanoma ocular correspondientes a dos pacientes. Los cortes de 5 μm fueron desparafinados y rehidratados en escala descendiente de etanol hasta agua destilada. Aquellos cortes que poseían una intensa pigmentación fueron sometidos a un blanqueamiento de melanina en una solución de permanganato de potasio al 0.05% (SUDELAB, Santiago, Chile.) durante 1 a 2 horas y luego revelados en una solución de ácido oxálico al a 0.1% hasta que desapareciese el color.

La inmunohistoquímica se desarrolló utilizando el Kit Universal LSAB Peroxidase K683 (DAKO, Glostrup, Denmark.). Resumidamente, se bloqueó la actividad de la

peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min. Después de un lavado con PBS, los cortes fueron incubados con suero bloqueador de unión inespecífica de equino por 10 min. Sin lavar, las muestras se incubaron durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario MP1-1B7 (anti-MC1R) o con el anticuerpo anti-9.2.31 (anti-melanoma) gentilmente donados por el Dr. Vijay Chhajlani (Astra Hassle AB, Suecia) en una concentración de 10 µg/ml, o con un anticuerpo irrelevante HB104 (anti H-2K^d) para las muestras control.

Luego de 3 lavados con PBS de 5 min. cada uno, los cortes se incubaron durante 15 min., con anticuerpo monoclonal anti-Ig de ratón biotinilado. Se repitió el lavado y se aplicó el complejo estreptavidina-peroxidasa por otros 15 min. Después de un buen lavado se incubó el substrato AEC Chromogen por 5-15 min. La expresión de la proteína MC1R fue evaluada en un microscopio convencional, utilizando una escala arbitraria basada en la intensidad de la inmunoreactividad, mientras que las fotografías fueron obtenidas a través de un microscopio invertido adosado a un sistema digital de captura de imágenes, gentilmente facilitado por el Dr. José Manuel Ojeda (Virología, ICBM, U. de Chile.) que permitió el registro y presentación de resultados.

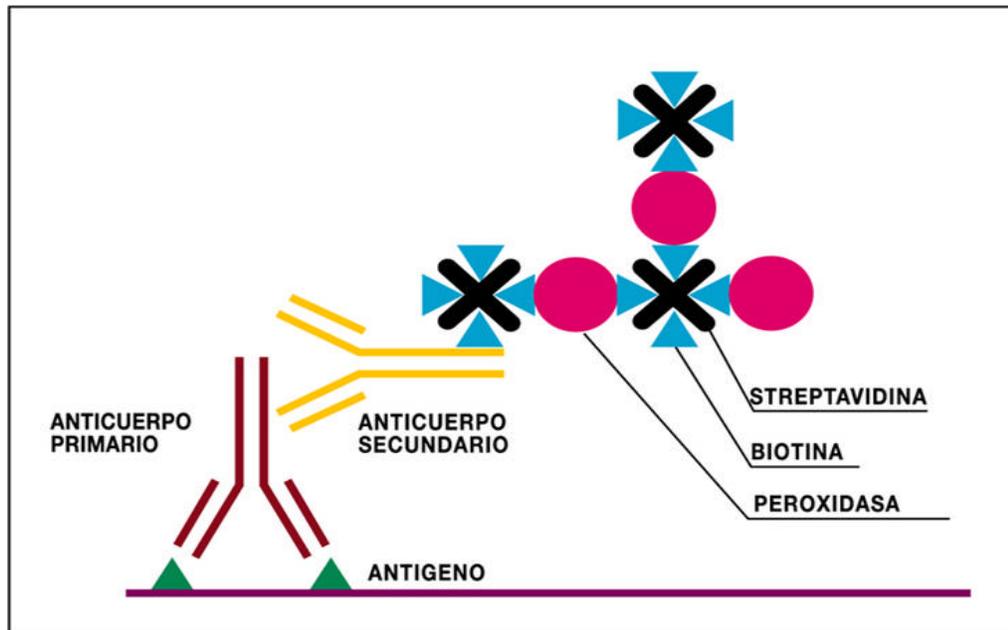


Figura 1: Diagrama que muestra la técnica de inmunohistoquímica. El antígeno MC1R. es detectado por el anticuerpo primario de ratón MP1-1B7, al cual se le une el anticuerpo secundario biotinilado anti Ig de ratón. Mediante la molécula biotina se une el complejo streptavidina-peroxidasa, esta enzima es la que cataliza la transformación del cromógeno AEC en un compuesto coloreado insoluble que se deposita en el sector donde se encuentra el antígeno

2. Cultivos celulares:

Las líneas de melanoma FMS, FM55 y 397, además de los melanomas oculares OMC1 y OMC3, fueron establecidas por el Dr. Flavio Salazar en el Instituto Karolinska. Ellas derivan de lesiones metastásicas de pacientes con melanoma tratados en el Radiumhemmet, Hospital Karolinska. Las líneas T2, una línea celular TAP mutante y C1R-A2, una línea deficiente para la expresión de MHC clase I y transfectadas con HLA-A2, fueron utilizadas como células blanco cargadas de péptidos exógenos en ensayos de liberación de ^{51}Cr como ha sido descrito (Salazar-Onfray et al 1997). Las células fueron mantenidas a 37°C y alimentadas 2 a 3 veces por semana en medio RPMI 1640 (GIBCO

BRL, Gaithersburg, NY, USA.) suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (FBS), 1% L-glutamina (GIBCO BRL, Gaithersburg, NY, USA.) y 1% Penicilina-estreptomicina (SIGMA, St. Louis, USA.).

3. Inmunocitoquímica para cultivos celulares:

Se utilizaron células de melanoma y melanocitos (Si2-II), facilitados por la Dra. Luz María Muñoz (Virología, ICBM, U. de Chile.), las que fueron sembradas en portaobjetos estériles. Al lograr la adherencia propia de estas células, las preparaciones fueron lavadas en PBS y fijadas en metanol 100% frío a 4°C por 10 min. para iniciar la tinción inmunoespecífica descrita anteriormente.

4. Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC):

Concentrados leucocitarios de donantes normales (buffy coat) de 50 ml, donados por el Banco de Sangre del Hospital San José, fueron mezclados con 40 ml de PBS estéril. Cada muestra fue separada en tres tubos cónicos de 50 ml que contenían 10 ml de Lymphoprep® (NYCOMED PHARMA, Oslo, Norway.) y centrifugada durante 20 minutos a 1200 r.p.m. sin freno con una temperatura de 4°C utilizando una centrifuga refrigerada IEC modelo MP4R (MA, USA). Después se transfirió la banda de mononucleares con pipeta Pasteur a tubos cónicos y se lavó tres veces con un volumen de 20 ml de PBS durante 4 min. a 1400 r.p.m., resuspendiéndose en un volumen final de 15 ml para su cuantificación y determinación de viabilidad por exclusión con Azul tripano.

5. Preparación de Dynabeads®:

Para la técnica de tipificación y de separación celular se utilizaron partículas de hierro Dynabeads® (DYNAL, Oslo, Norway.) que están acopladas a anticuerpos específicos contra inmunoglobulinas de ratón permitiendo su acoplamiento a anticuerpos generados en ratón de amplias especificidades. Se prepararon 1×10^7 partículas para 2 μg de anticuerpo secundario incubando 30 min. a 4°C , para luego lavar 3 veces en tampón PBS 0.1% BSA utilizando el concentrador magnético de partículas (DYNAL, Oslo, Norway.)

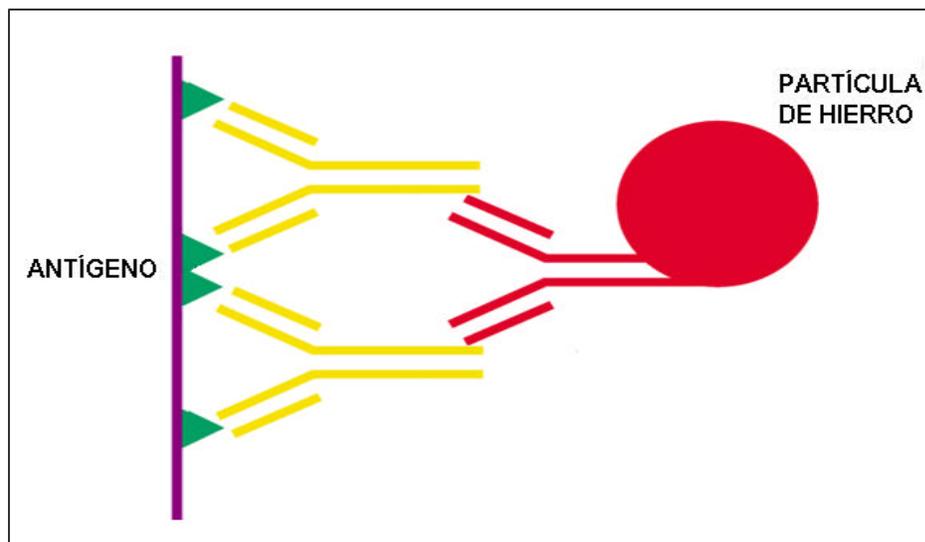


Figura 2: Diagrama que muestra la preparación de Dynabeads®. La partícula de hierro (bead) está conjugada con un anticuerpo de cabra (rojo) anti fragmento FC de Ig de ratón, el cual se une al anticuerpo monoclonal de interés, (amarillo) esto permitió la separación y tipificación de varias poblaciones celulares según uno de los antígenos de superficie.

6. Tipificación de antígeno HLA-A2:

Se incubó 15 μl de la suspensión celular de mononucleares con 5 μl de Dynabeads® conjugados con anticuerpos de ratón anti HLA-A2 en tubos de ensayo durante 10 minutos.

Se aplicaron 10 μ l de esta solución en cámaras de Bürker. Bajo el microscopio las muestras positivas presentaron rosetas formadas por las partículas de hierro. Las células HLA-A2 positivas fueron utilizadas para la inducción y estimulación de células CTL péptido específicas, mientras que las células HLA-A2 negativas se destinaron para la producción de células de sustento utilizadas en el cultivo de linfocitos.

7. *Irradiación de células:*

Las células HLA-A2 negativas en suspensión y DC cargadas con péptidos fueron irradiadas, para evitar su proliferación, con una dosis de 25 RAD bajo una fuente de ^{60}Co en el reactor de la Comisión Chilena de Energía Nuclear de La Reina.

8. *Inactivación celular por Mitomicina C:*

Para evitar la proliferación de células presentadoras de péptidos o para la preparación de células de sustento, se utilizó Mitomicina C, aplicada en una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para 1 a 1.5×10^6 células/ml, incubando 45 min. a 37°C . Después se realizaron 3 lavados con medio RPMI 10% FBS.

9. *Preparación de células de sustento:*

La suspensión celular de sustento se utiliza como un medio que ofrece condiciones óptimas para la sobrevivencia y proliferación de bajas cantidades de líneas y clones CTL. Consiste en 1.5×10^6 de PBMC HLA-A2 negativas irradiadas /ml de medio provenientes de dos donantes distintos, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de fitohematoglutinina (PHA) y 50 unidades/ml de IL-2, todo en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS).

10. Descongelación de células:

Células establecidas por el Dr Flavio Salazar, mantenidas en crioviales en nitrógeno líquido, fueron descongeladas en agua a 37°C. Rápidamente el contenido de los crioviales fue lavado 3 veces en 2,5 ml de RPMI %5 FBS, centrifugando a 1200 r.p.m. por 3 min. La concentración final de células en la siembra fue de 1 a 1.5×10^6 céls/ml aproximadamente.

11. Producción de líneas CTL péptido-específicas

El procedimiento seguido fue de acuerdo al protocolo EUCAPS para la generación de CTL específicas anti-péptido a partir de PBMC frescas de donantes normales.

- *Cultivo de células estimuladoras (DC):*

Día -7: Fueron plaqueadas 20×10^6 PBMC contenidas en 3 ml de RPMI 10% FBS, por recipiente, en placas de cultivo de 6 pocillos. Se incubó por 2 horas a 37°C, al finalizar se agitó suavemente la placa y se recolectó el medio que contenía las células no adherentes. Se lavaron los pocillos con 2 ml RPMI 10% SFB para remover el resto de células no adherentes. Éstas fueron congeladas y utilizadas posteriormente como células respondedoras. Luego se agregó 2.5 ml de RPMI 10% SFB que contenía 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4 a cada pocillo, iniciándose así la diferenciación de monocitos a células dendríticas. Las PBMC que no fueron utilizadas fueron congeladas y utilizadas más tarde.

Día -5: Se agregó 2.5 ml de RPMI 10% SFB suplementado con 1600 U/ml de GM-SCF y 1000 U/ml de IL-4.

Día -3: Fueron restituidos 2.5 ml de RPMI 10% SFB por otros que contenían 1600 U/ml de GM-SCF y 1000 U/ml de IL-4.

Día -1: Un ml de medio fue reemplazado por 1 ml de RPMI 10% SFB que contenía 10 ng/ml de TNF- α . De ésta forma se induce el desarrollo de células dendríticas a un estado maduro.

Día 0: Fueron cosechadas las DC cultivadas. Se lavó dos veces en RPMI 10% SFB. Se resuspendió en 1 ml de medio que contenía 20 μ g/ml de péptido, de esta forma se cargan las DC con péptidos sintéticos al incubarse a 26°C por 4 horas agitando suavemente cada hora, para luego irradiar a 25 RAD y realizar 2 lavados con medio, quedando en una concentración final de 0.3×10^6 /ml en RPMI 10% SFB.

- *Estímulo de CTL:* Fue descongelada la fracción de células respondedoras no adherentes del día -7 y resuspendidas en una concentración de 3×10^6 cels/ml. Se utilizó una razón de 10 células respondedoras por 1 célula estimuladora. Fueron mezcladas y cultivadas en placas de 24 pocillos con un volumen final de 1 ml de medio RPMI 10% SFB que contenía 20 ng/ml de IL-7 y 100 pg/ml de IL-12.

Día 7: Un ml de medio fue reemplazado con 1 ml de que contenía 20 ng/ml de IL-7.

Día 12: PBMC autólogo provenientes del día -7 se descongelaron e irradiaron a 25 RAD fue lavado y resuspendido en una concentración final de 4×10^6 cels/ml sembradas en placa de 24 pocillos en 1 ml e incubadas por 2 horas a 37°C. Luego se agitó la placa y se colectó el medio lavando suavemente descartando así las células no adherentes. Se agregó 0.5 ml de medio RPMI 10% SFB conteniendo 20 μ g/ml de péptido MCIR 291 a las células adherentes incubando por 2 horas a 37°C. Finalmente se removió el medio y se agregó 1 ml de suspensión de células respondedoras (1.5×10^6 cels/ml) que habían sido colectadas, separadas por Lymphoprep®, lavadas y contadas.

Día 14: Fue agregado 1 ml de RPMI 10% SFB que contenía 20 U/ml de IL-2 a cada pocillo.

Día 19: Se reestimuló como en el día 12.

Día 21: Fue agregado medio con IL-2 como en el día 14.

Día 26: Se reestimuló como en el día 12 y bajo el microscopio se evaluó la razón de poblaciones CD8/CD4, al tomar una alícuota de 15µl del cultivo e incubando con 5µl anticuerpo anti CD8 o CD4 conjugados con Dynabeads®

Día 28: Fue agregado medio con IL-2 como en el día 14.

Día 33: Las células respondedoras fueron colectadas y se realizó la separación de linfocitos CD8/CD4.

12. Separación de células CD8/CD4:

La suspensión de linfocitos fue colectada con una concentración de 2.5×10^6 cels/ml. Se utilizaron aproximadamente 1×10^7 partículas Dynabeads® para la selección positiva (25 µl), es decir una razón aproximada de 4 partículas por célula. La preparación de anticuerpo primario-Dynabeads® se incubó por 20 min. a 4°C con agitación. Utilizando el concentrador magnético de partículas (DYNAL, Oslo, Norway.) se realizaron 3 lavados con PBS 0.1% BSA, y se sembraron en placas de cultivo en medio RPMI 10% FSB más 20 U/ml IL-2.

13. Citometría de flujo:

Para detectar marcadores celulares de membrana se fijaron 1.5×10^5 células con 0.5 % formaldehído en PBS durante 10 min a 37°C. Después de un lavado con PBS, se colocaron 50 μ l de medio RPMI que contenían los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC o PE (PHARMINGEN, San Diego, CA, USA.) en una concentración de 1-2 μ g/ml. También se preparó el mismo volumen de medio sin anticuerpo como control negativo. La incubación fue de 30 min a 4°C. Se almacenó en 100 μ l de PBS azida con 1% formaldehído, y a 4°C en un tubo bien cerrado protegido de la luz hasta su lectura en citómetro de flujo FACscan (BECTON DICKINSON, San Diego, CA, USA.) en la Unidad de Inmunología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

14. Ensayo de liberación de ^{51}Cr :

Para analizar el reconocimiento de los antígenos por los CTL se tomaron 5×10^5 células C1R-A2 contenidas en 0.5 ml, las cuales fueron cargadas con el péptido MCIR 291 (10 μ g/ml) a 26°C por 2 horas. Estas células, en conjunto con las líneas de melanoma FMS y OMC1 y OMC3, se marcaron con 25 μ l de ^{51}Cr (10 μ Cu/ml) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se utilizaron 2 relaciones de células efectoras y células blanco (E:T ratio) 10:1 y 25:1, las que fueron incubadas por 6 hrs. a 37°. Se incluyeron pruebas de emisión espontánea y máxima. La línea celular K562, sensible a la actividad NK, fue utilizada como control de especificidad. Los sobrenadantes fueron recolectados y su radioactividad se determinó usando un contador de radiación gamma PACKARD modelo Cobra . El porcentaje de lisis se calculó de acuerdo a la siguiente formula: % = 100 x ((liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea.)

RESULTADOS:

1. Inmunohistoquímica de tejidos de melanoma:

Utilizando el anticuerpo monoclonal MP1-1B7 (anti-MC1R) en cortes en parafina obtenidos de biopsias de tejidos melanómicos, se observó una sobre expresión de MC1R en melanoma maligno de origen cutáneo, como también en melanoma ocular, en comparación con la presencia de este antígeno en nevus benignos. (Tabla 1). Además se pudo apreciar una baja expresión de la proteína en queratinocitos normales. (Fig. 3). Importante resulta la expresión de MC1R en diversas metástasis, en niveles comparables a los melanomas primarios (Tabla 1, Fig. 3). El anticuerpo monoclonal 9.2.27, específico para melanoma, corroboró el origen melanómico de los tejidos correspondientes (datos no incluidos).

Tabla 1: Expresión del antígeno MC1R en cortes de tejido medida por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal MP1-1B7 como se describe en material y métodos.

Tejido	Intensidad de Tinción
Nevo Azul	-
Melanoma Primario Cutáneo	+++
Metástasis ganglionar	+++
Metástasis Maxilar	+++
Metástasis Cerebral	+++
Metástasis Intestinal	+++
Melanoma Ocular 1	++
Melanoma Ocular 2	+++

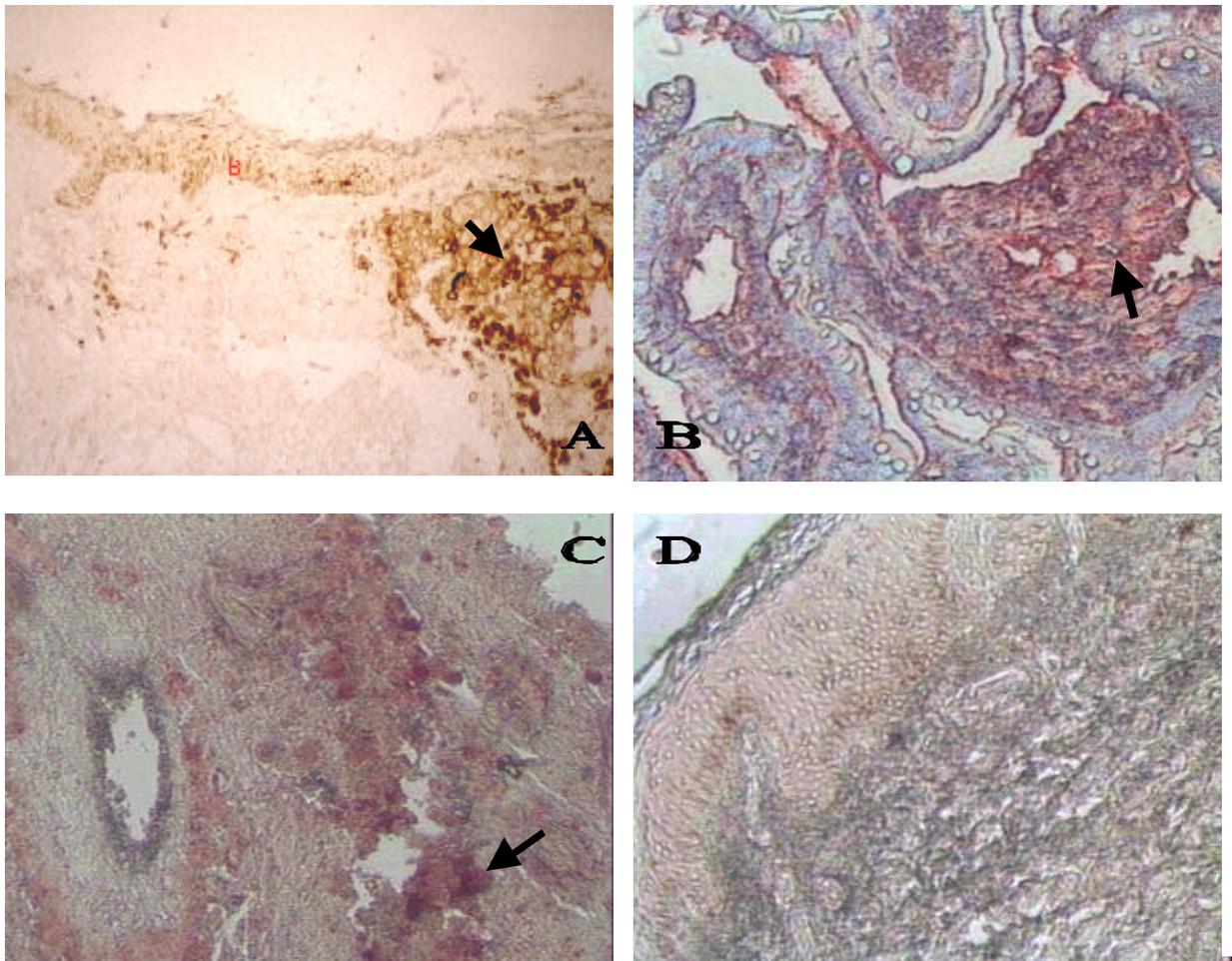


Figura 3: Localización del antígeno MC1R en: A) melanoma cutáneo primario 5x, B) Metástasis intestinal 10x, C) Melanoma uveal 10x y D) Nevo azul 10x, utilizando el anticuerpo MP1-1B7 (anti-MC1R) como se describe en material y métodos.

2. Inmunocitoquímica en Líneas Celulares:

La técnica inmunocitoquímica reveló una fuerte expresión de MC1R en la totalidad de las líneas de melanomas analizadas (n=4), incluyendo a las de origen uveal (n=2) (Tabla 2). También se detectó el antígeno en cultivos de melanocitos normales aunque con niveles de expresión menores a los detectados en melanoma (Fig. 4). No se detectó la presencia de MC1R en líneas celulares no melanómicas.

Tabla 2: Expresión del antígeno MC1R en líneas de melanoma mediante inmunohistoquímica por el anticuerpo monoclonal MP1-1B7 como se describe en materiales y métodos

Línea Celular	Intensidad de la Tinción
Melanocitos Si2-II	+
Melanoma FMS	+++
Melanoma FM 55	+++
Melanoma Ocular OMC-1	+++
Melanoma Ocular OMC-3	+++
Control COS-7	-

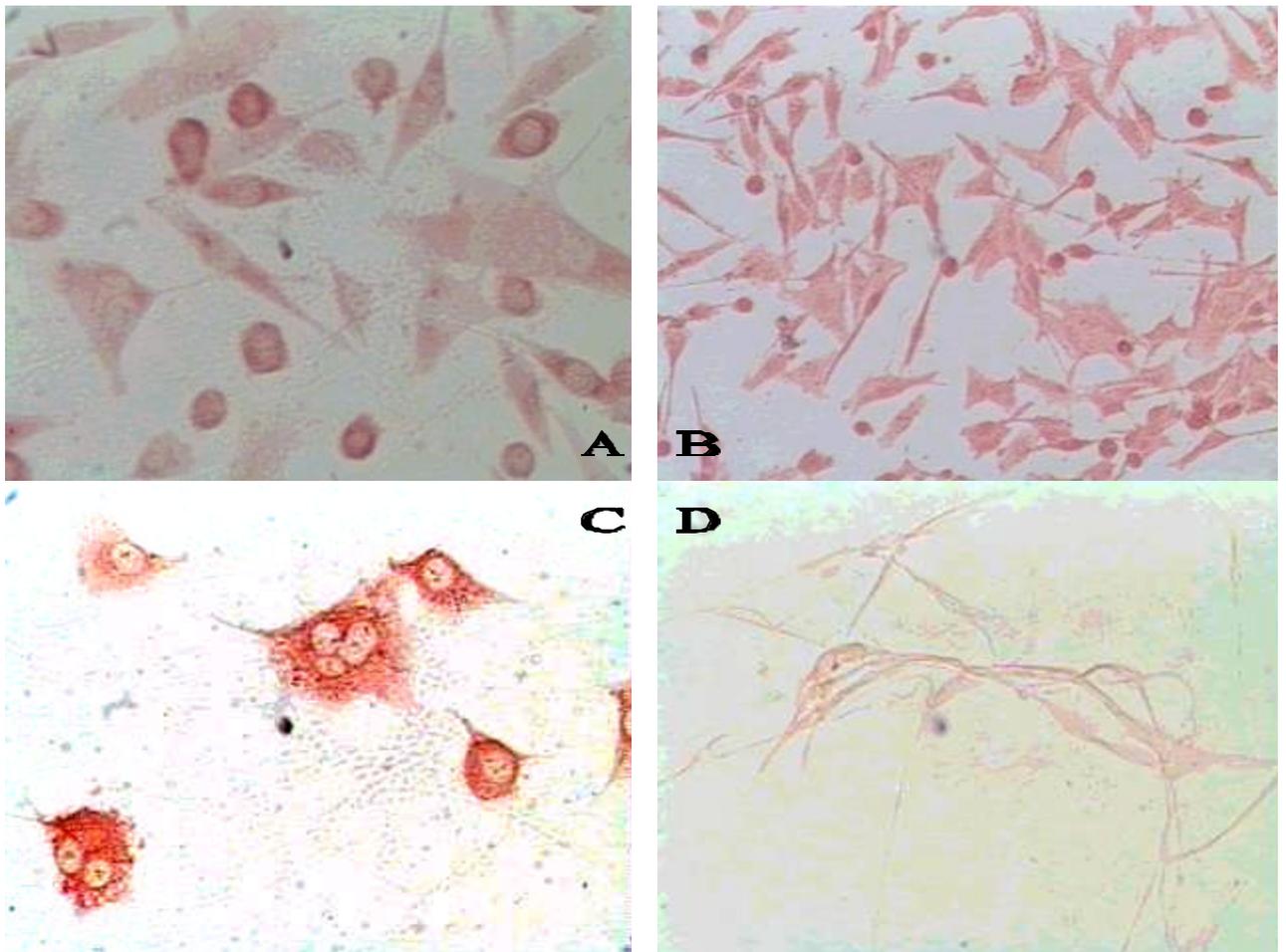


Figura 4: Localización del antígeno MC1R en: A) Línea de melanoma FM 55 40x, B) Línea de Melanoma FMS 10x, C) Línea de Melanoma ocular OMC3 40x y D) Melanocitos Si2-II 40x, utilizando el anticuerpo MP1-1B7 (anti-MC1R) como se describe en material y métodos.

3. Separación de linfocitos T citotóxicos:

Sangre periférica de un donante normal (P58) fue estimulada tres veces con células presentadoras autólogas cargadas con el péptido MC1R 291. Después de la tercera restimulación, los linfocitos del donante P58 fueron marcados con anticuerpos conjugados con fluorocromos. Se evaluó la razón CD8/CD4 lo que indicó que del total de la población de células, un 41% correspondió a linfocitos CD8+. Fue por ello necesario realizar un enriquecimiento de células citotóxicas, mediante el uso de Dynabeads® acoplados a anticuerpos anti-CD8. Mas tarde fue corroborada la eficacia de la separación celular mediante un estudio de Citometría de flujo (Fig 5). En este estudio se comprobó que se había logrado enriquecer la población de linfocitos CD8+ a un 91% del total.

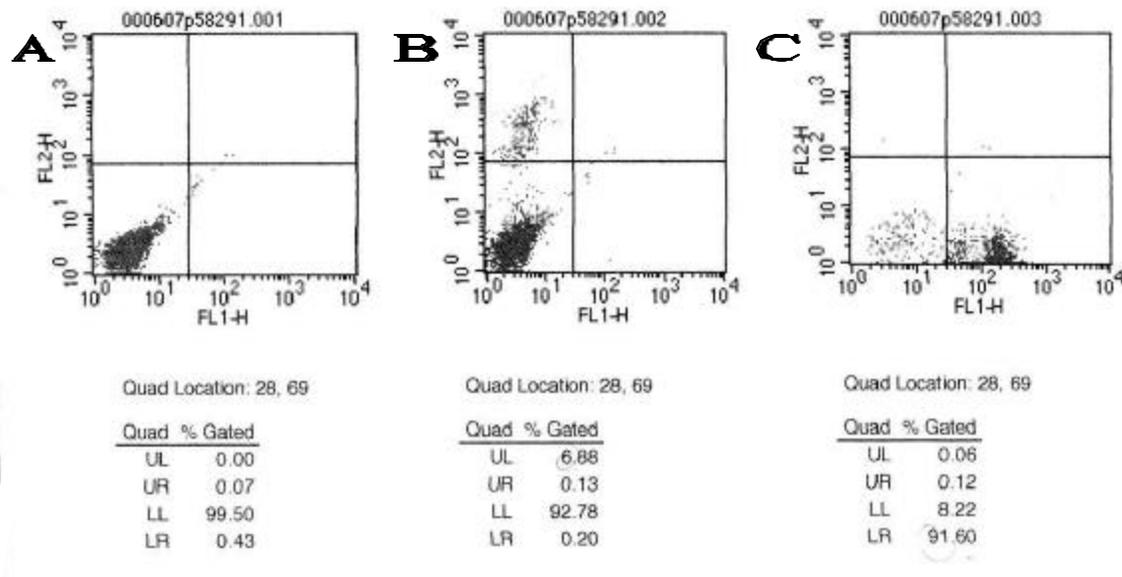


Fig 5: Citometría de flujo para detección de poblaciones de linfocitos CD8/CD4. A) Células sin anticuerpos B) Células conjugadas sólo con AcMo anti CD4 conjugado con PE C) Células conjugadas sólo con AcMo anti CD8 conjugado con FITC.

