

UCH-FC
Biotecnología
P433
C.1

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**EXPRESIÓN CONSTITUTIVA E INDUCIBLE DEL RECEPTOR DE
MELANOCORTINA 1 (MC1R) EN MELANOMA OCULAR MALIGNO**

Memoria de Título entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por
Cristián Javier Pereda Ramos

Abril, 2006
Santiago - Chile



Director de Tesis: Dr. Flavio Salazar Onfray
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



**“EXPRESIÓN CONSTITUTIVA E INDUCIBLE DEL
RECEPTOR DE MELANOCORTINA 1(MC1R) EN
MELANOMA OCULAR MALIGNO”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CRISTIAN JAVIER PEREDA RAMOS

Dr. Flavio Salazar Onfray
Director Seminario de Título

A blue ink signature of Dr. Flavio Salazar Onfray, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

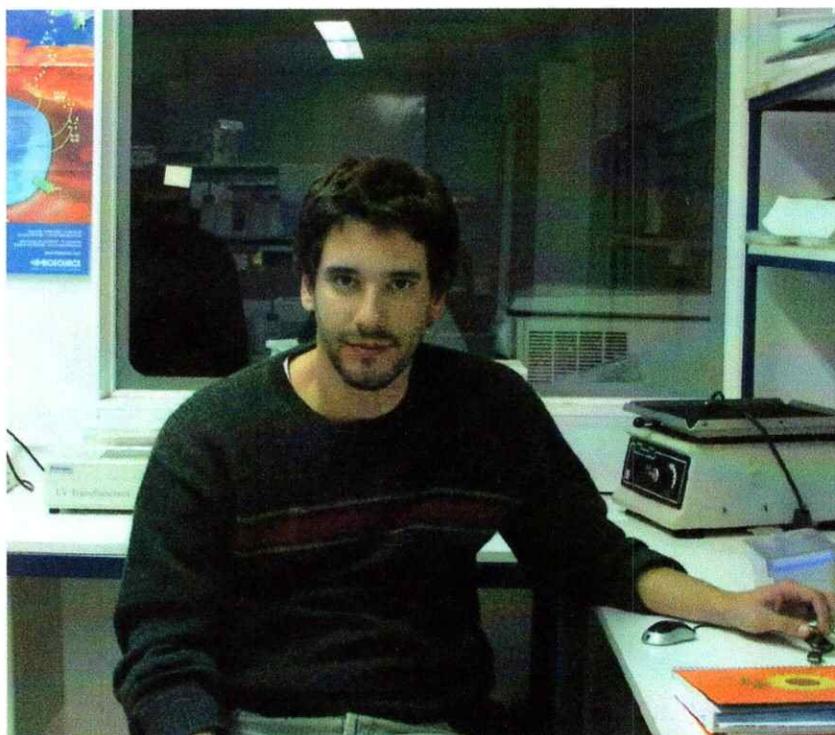
A blue ink signature of Dra. María Rosa Bono Merino, written over a horizontal line.

Dr. Mario Rosemblatt Silber
Corrector

A blue ink signature of Dr. Mario Rosemblatt Silber, written over a horizontal line.



Santiago de Chile, _____ 2006



Ingresé a la Facultad de Ciencias el año 98, sin una vocación definida, pero con muchas ganas de aprender todo lo relacionado a la ciencia. Al poco tiempo fui descubriendo una inmensa variedad de áreas y desafíos que abordar utilizando el método científico. Por otra parte, también encontré motivación en las variadas actividades de crecimiento personal que nuestra Universidad pone a nuestra disposición. En parte por mis intereses académicos y también por cosas del destino, realicé mi tesis en un área fascinante como la inmunología aplicada. Durante este tiempo pude conocer no solo los aspectos teóricos de la inmunología, sino que además he visto de cerca las implicancias humanas que encierra esta investigación, a partir de mi participación en el diseño e ejecución de proyectos clínicos. La exploración que he realizado en esta compleja área del conocimiento se vio facilitada por el excelente nivel de enseñanza recibida durante los años de pregrado, tanto por parte de los profesores de la Facultad de Ciencias como del Programa Disciplinario de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas. Ellos me entregaron las herramientas necesarias para poder abordar y solucionar de la mejor forma las interrogantes que debemos enfrentar a diario en la búsqueda del conocimiento y los problemas cotidianos que implica el trabajo grupal. Espero poder aplicar los conocimientos adquiridos en mi futura labor profesional, para así aportar al desarrollo de la ciencia en beneficio de la gente de mi País.

INDICE GENERAL



INDICE GENERAL.....	ii
INDICE DE TABLA.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES.....	13
2.1 Reactivos Generales.....	13
2.2 Equipos.....	14
3. METODOS.....	15
3.1 Líneas celulares.....	15
3.2 Congelamiento y descongelamiento de células.....	15
3.3 Establecimiento de líneas celulares de melanoma ocular a partir de biopsias provenientes de enucleaciones.....	16
3.4 Citometría de flujo.....	17
3.5 Análisis de Inmunohistoquímica en cortes desparafinados.....	18

3.6 Análisis Inmunocitoquímico.....	19
3.7 Preparación de extracto proteico.....	19
3.8 Western blot.....	20
3.9 Inducción de expresión en membrana plasmática de MC1R en líneas de melanoma ocular.....	20
3.10 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica a partir de concentrados leucocitarios de donantes normales.....	21
3.11 Aislamiento de células Natural Killer (NK) a partir de linfocitos de sangre periférica.....	22
3.12 Cultivo de células NK.....	23
3.13 Ensayo de citotoxicidad mediada por anticuerpos.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Estudio de la expresión de MC1R en líneas celulares de melanoma ocular mediante Western blot.....	24
4.2 Detección de MC1R en tejidos frescos de melanoma ocular utilizando citometría de flujo.....	26
4.3 Estudio de la expresión de MC1R en tejidos de melanoma ocular desparafinados a través de inmunohistoquímica.....	28
4.4 Inducción de expresión en membrana plasmática de MC1R en líneas de melanoma ocular.....	33
4.5 Separación y caracterización de células NK de linfocitos de sangre periférica.....	38
4.6 Ensayo de citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC).....	40
5. DISCUSION.....	42
6. CONCLUSIONES.....	47



INDICE DE TABLA

Tabla 1. Expresión de MC1R en tejidos de melanoma ocular29



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Receptor de melanocortina 1.	5
Figura 2. Líneas de linfocitos T citotóxicos generadas por inmunología reversa.....	8
Figura 3. Detección de la proteína MC1R en células de melanoma de origen uveal mediante Western blot.....	25
Figura 4. Células de tejidos frescos de melanoma ocular expresan MC1R.....	27
Figura 5. MC1R es homogéneamente detectado en tejidos frescos de melanoma ocular primario y metastásico	32
Figura 6. La expresión en superficie de MC1R es aumentada por citoquinas pro-inflamatorias en melanoma ocular	35
Figura 7. Cinética de expresión de MC1R en la membrana plasmática de melanoma ocular después de tratamiento con citoquinas.	37
Figura 8. Caracterización de células en cultivo antes y después de separación con beads	39
Figura 9. Ensayo de citotoxicidad mediado por células dependientes de anticuerpos (ADCC).....	41



LISTA DE ABREVIATURAS

MC1R:	Receptor de Melanocortina 1
AcMo:	Anticuerpo Monoclonal
AAT:	Antígeno asociado a tumor
α -MSH:	Hormona estimulante de melanocitos alfa
POMC:	Proiomelanocortina
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida
ADCC:	Citotoxicidad mediada por anticuerpo (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
CPA:	Célula presentadora de antígenos
LTC:	Linfocito T citotóxico
SFB:	Suero fetal bovino
TIL:	Linfocito infiltrante de tumor
DMSO:	Dimetilsulfóxido
PKA/C:	Proteína Kinasa A/C
KDa:	KiloDalton
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
NK:	Asesinas naturales (Natural Killer)
HLA:	Antígenos leucocitarios humanos (Human Leukocyte Antigen)

RESUMEN

El melanoma ocular es un tumor altamente maligno y el más común de los oculares en individuos adultos. A diferencia del melanoma cutáneo, el melanoma uveal presenta distintos niveles de expresión de marcadores de melanoma. Recientemente, se describió una fuerte expresión del receptor de melanocortina 1 (MC1R), un marcador específico de melanoma, tanto en lesiones primarias como metastásicas. En el presente trabajo, se analizó la expresión de MC1R en melanoma uveal utilizando un anticuerpo monoclonal (MP1.1C-11) que reconoce la porción extracelular de MC1R y se comparó con otros marcadores utilizados comúnmente en el diagnóstico, tales como S100, HMB-45 y A103. Diecisiete tejidos de melanoma ocular fueron teñidos y analizados según la intensidad de la inmunoreactividad. La proteína MC1R fue detectada en un 95% (16/17) de los melanomas analizados, incluyendo una metástasis de hígado. HMB-45 tiñó un 66% (8/12) de los melanomas testeados. Además, se encontró que la intensidad para el anticuerpo S-100 fue menor en melanomas uveales que en melanomas cutáneos, tiñendo sólo un 33% (5/15) de las muestras analizadas. El anticuerpo dirigido contra la proteína MART-1/Melan A (A103) reconoció 4 de 6 tejidos de melanoma ocular. En resumen, utilizando el anticuerpo MP1.1C11, la proteína MC1R demostró ser mayormente expresada en melanomas oculares que otras proteínas reconocidas por anticuerpos estándar, por lo que esta proteína debe ser incluida como blanco en los paneles de anticuerpos utilizados para el diagnóstico de lesiones melanocíticas. Una potencial terapia mediada por anticuerpos requiere de la presencia del antígeno en la superficie celular. MC1R se acumula comúnmente intracelularmente. En esta tesis, se demostró

que la expresión extracelular de MC1R puede ser inducida in-vitro incubando con diferentes citoquinas tales como IFN- γ , TNF- α e IL-10.

ABSTRACT

Uveal melanoma is a highly malignant tumor of the eye and it is the most common primary ocular cancer among adults. Compared to the cutaneous melanoma, the uveal melanoma express a different expression levels of melanoma markers. Recently, a strong expression of the melanocortin 1 Receptor (MC1R) was described in primary and metastatic melanoma. In this work, the expression of MC1R in uveal melanoma was analyzed using a monoclonal antibody (MP1.1C-11) that recognizes the extracellular region of MC1R and it was compared with other markers commonly used in the diagnosis, such as S100, HMB-45 and A103. Seventeen ocular melanoma samples were immunolabeled and analyzed according to the intensity of the immunoreactivity. The MC1R protein was detected in 95% (16/17) of the analyzed melanomas, including a liver metastasis. HMB-45 stained 66% (8/12) of the tested melanomas. In addition, we found that the sensitivity for S100 was lower in uveal melanomas than in cutaneous melanomas, staining only a 33% (5/15) of the analyzed sample. The antibody directed against the protein MART-1/Melan A (A103) recognized 4 of 6 samples of ocular melanoma. In summary, using the MP1.1C11 antibody, the MC1R protein showed to be more expressed in ocular melanomas than other proteins recognized by standard antibodies. Therefore, this protein should be included as a target in the common panel of antibodies used in the diagnosis melanocytic lesions. A potential immunotherapy using antibodies requires the presence of the antigen in the cell surface. MC1R accumulates commonly intracellularly. In this thesis, it was shown that the extracellular expression of MC1R can be induced in-vitro with the incubation with different cytokines such as IFN-

γ , TNF- α and IL-10.

1. INTRODUCCION

En las últimas décadas se han logrado importantes avances en la lucha contra el cáncer, sin embargo, esta enfermedad sigue siendo una de las principales causas de muerte, especialmente entre los habitantes de países con alto nivel de desarrollo.

Modernas técnicas de cirugía y transplantes, nuevos y más efectivos fármacos y mejores métodos de irradiación han permitido tratar con resultados promisorios esta patología. Sin embargo, frecuentemente algunas células malignas sobreviven a estas terapias y se diseminan en el organismo, haciendo necesario el desarrollo de técnicas de diagnóstico más precisas y de tratamientos alternativos o complementarios a los actuales.

El melanoma ocular, que deriva de la coroides o del cuerpo ciliar del ojo, es un tumor altamente maligno y, aunque raro, es el cáncer ocular más común en individuos adultos, con una incidencia aproximada de 5 por millón por año (Damato B., 2004). Este tumor generalmente se encuentra localizado en la parte posterior del ojo y cuando es diagnosticado tempranamente, puede existir un tratamiento efectivo de la lesión primaria, sin embargo, esto no previene el desarrollo de metástasis. El melanoma ocular se caracteriza por presentar una diseminación hematológica al hígado, provocando que más del 50% de los pacientes fallezcan de metástasis hepáticas.

Los marcadores de superficie del melanoma ocular poseen diferentes patrones de expresión comparado con los melanomas cutáneos. Se ha demostrado que estos tumores expresan marcadores asociados a melanoma, los que pueden ser utilizados para el diagnóstico de lesiones tumorales. La confirmación a través de ensayos de inmunohistoquímica es esencial para el diagnóstico de esta enfermedad debido a la

morfología heterogénea de estos tumores. En el presente, las tres tinciones más utilizadas en inmunohistoquímica son: S-100, anticuerpo dirigido a una proteína derivada del cerebro bovino, el cual presenta una reacción cruzada con tejidos de melanoma y melanocitos (Cochran AJ. y col., 1983), el anticuerpo HBM45, que tiñe la proteína melanosomal gp100 (Kapur RP. y col., 1992) y el anticuerpo A103 que reconoce la proteína Melan-A/Mart-1 (Kawakami Y. y col., 1994; Coulie PG. y col., 1994) ambas relacionadas a la síntesis de la melanina. Sin embargo, debido a la variable especificidad y sensibilidad de los marcadores y a la expresión diferencial de las distintas proteínas asociadas a melanoma en diferentes lesiones causada por mutaciones y/o presiones inmunológicas, nuevos marcadores son necesarios para obtener un diagnóstico más preciso.

Técnicas tradicionales de tratamiento, como enucleación, radioterapia, cirugía y termoterapia transpupilar, no disminuyen la mortalidad causada por la metástasis de este cáncer. Entre las nuevas alternativas de tratamiento que se están desarrollando, se encuentra la manipulación del sistema inmune para combatir a los tumores, lo que se denomina inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos de estas terapias consisten en inmunizaciones pasivas inespecíficas como el uso de citoquinas (Lotze M.T. y col., 1986), específicas como anticuerpos contra antígenos tumorales (Stern M., Herrmann R., 2005) o linfocitos T tumor-específicos (terapia adoptiva) (Dudley ME., Rosenberg SA., 2003). Por otra parte se han desarrollado terapias inmunológicas activas tales como son vacunas de células tumorales autólogas modificadas, péptidos antigénicos sintéticos o vacunas autólogas de células presentadoras de antígenos, especialmente células dendríticas cargadas con antígenos tumorales. Estas últimas están siendo desarrolladas

para el tratamiento de melanoma cutáneo en pacientes con metástasis avanzadas (Escobar y col., 2004; Banchereau J., Palucka AK., 2005). Tratamientos similares podrían beneficiar a pacientes con melanoma ocular. Esto ha sido posible gracias al gran avance que se ha experimentado en la comprensión del funcionamiento del sistema inmune durante los últimos treinta años, especialmente en relación al reconocimiento antigénico (Zinkernagel RM., Doherty PC., 1974; Townsend AR. y col., 1985). Por otra parte, el gran impulso de las técnicas de biología molecular que facilitan el clonamiento de genes y la producción de proteínas recombinantes, ha permitido la identificación de antígenos asociados a tumores (AAT) y su posterior caracterización.

Hace algunos años, en el laboratorio del Dr. Salazar, utilizando anticuerpos específicos, hemos descrito la expresión del marcador de melanoma, receptor de melanocortina 1 (MC1R) en tejidos normales y tumorales (Salazar-Onfray F. y col., 2002). MC1R es uno de los cinco receptores de melanocortina que han sido descritos y clonados hasta el momento. Éstos pertenecen a la familia de receptores clase A acoplados a proteína G y todos ellos están funcionalmente acoplados a la adenilato ciclasa y median sus efectos activando una vía de señales dependiente de AMP cíclico (Cone RD., 2000; Rana BK., 2003). Aunque pertenecen a una familia única de receptores y todos difieren en la especificidad por sus ligandos y en su distribución tisular, comparten características de otros receptores acoplados a proteína G; poseen varios sitios potenciales de glicosilación en sus dominios amino-terminales, sitios de reconocimiento consenso para proteína kinasa C (PKC) y/o A (PKA), y cisteínas conservadas en sus carboxilo-terminales (Wikberg JE. y col., 2000). La hormona adrenocortitrópica y las hormonas melanocitos estimulantes (α -, β - y γ -MSH) se denominan melanocortinas ya que derivan del

procesamiento post-translacional de la molécula proopiomelanocortina (POMC)(Eberle A., 1998) y son producidas principalmente en la glándula pituitaria, aunque algunas células inmunocompetentes como macrófagos y queratinocitos también la expresan (Schauer E. y col., 1994; Star RA. y col., 1995)

El gen de MC1R fue el primero de estos receptores en ser clonado (Chhajlani V., Wikberg JE., 1992) y se encuentra localizado en el cromosoma 16q24.3 (Gantz I. y col., 1994). Es una proteína de 37 kDa (Salazar-Onfray F. y col., 2002) que está constituida por 317 aminoácidos con siete segmentos transmembrana, con la topografía característica de receptores unidos a proteínas G heterotriméricas (Figura 1). Las interacciones de MC1R con la α -MSH contribuyen a la regulación de la fisiología de la piel y a la melanogénesis (Slominsky A. y col., 2000). La unión de la α -MSH con MC1R en los melanocitos inicia una cascada de señales que activa la adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico e induce la actividad tirosinasa, la enzima limitante en la vía sintética de la eumelanina (Hunt G. y col., 1994; Abdel-Malek Z. y col., 2000). Esto permite que los melanocitos, presentes en abundancia entre la dermis y epidermis, formen el pigmento melanina y lo dispersen por la piel (Suzuki Y. 1996).

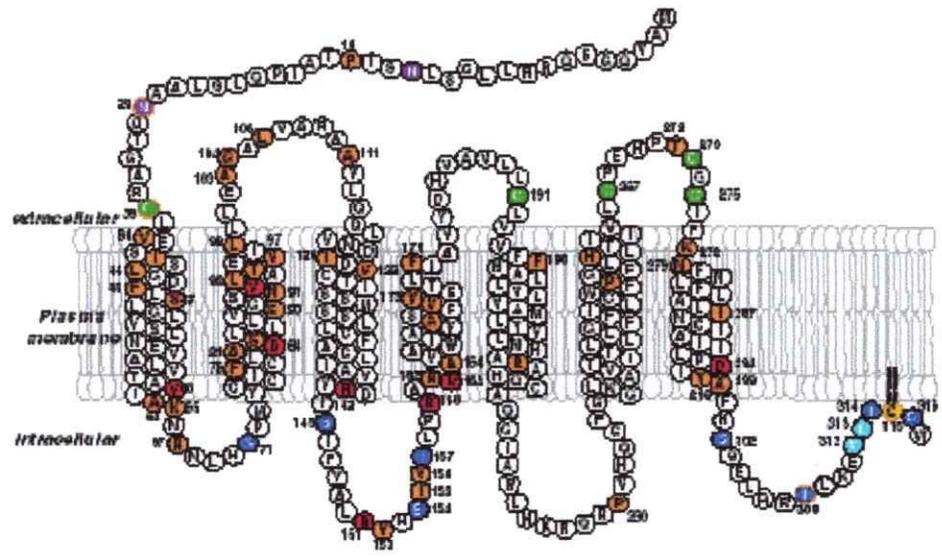


Figura 1. Receptor de melanocortina 1. El Receptor de Melanocortina 1 pertenece a la familia de receptores clase A con siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G y un sitio de anclaje a la membrana plasmática en el extremo carboxil-terminal. Posee varios sitios potenciales de N-glicosilación en su dominio amino-terminal y sitios de reconocimiento consenso para PKC y/o PKA, lo que podría indicar que presentan regulación por fosforilación y cisteínas en el carboxilo terminal.

Inicialmente se describió la presencia de MC1R en melanocitos y melanomas (Tatro JB. y col., 1990; Suzuki Y. y col., 1996; Xia Y. y col., 1996) aunque este receptor es expresado también, pero en baja proporción, en monocitos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos (Star RA. y col., 1995; Bhardwaj RS. y col., 1997; Taherzadeh S. y col., 1999; Catania A. y col., 1996; Bohm M. y col., 1999). Además, Salazar y cols. demostraron que éste receptor se expresa también en líneas celulares y tejidos frescos de melanoma cutáneo y en menores niveles de expresión en varios tejidos normales como queratinocitos, células dendríticas cultivadas *in vitro*, monocitos activados, en células de la glándula adrenal, cerebelo e hígado (Salazar-Onfray F. y col., 2002). La función de MC1R en estos tipos celulares, aparte de la melanogénesis, no ha sido esclarecida completamente, aunque algunos investigadores postulan que MC1R mediaría algunos de los efectos de la α -MSH en reacciones inmunes e inflamatorias (Scholzen T., y col., 1998; Bhardwaj RS. y col., 1994). Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Salazar utilizando métodos de inmunología reversa, lograron la identificación de tres péptidos restringidos al isotipo HLA-A2 derivados de la moléculas MC1R, con capacidad para generar una respuesta anti-peptídica mediada por linfocitos T citotóxicos (LTC) obtenidos de linfocitos de sangre periférica de donantes normales (Salazar-Onfray F. y col., 1997). Estos péptidos al ser presentados por monocitos previamente estimulados con las citoquinas IL-4 y GM-SCF en calidad de células presentadoras de antígenos (CPA), cargadas exógenamente con péptidos nonaméricos derivados de MC1R, fueron capaces de estimular linfocitos T CD8+ *in vitro*. Los linfocitos T CD8+, además de

reconocer células blanco (HLA-A2) cargadas exógenamente con el respectivo péptido, también fueron capaces de reconocer células transfectadas con el gen de MC1R y lo que es más importante, reconocer melanomas HLA-A2+ que expresan MC1R. Estos resultados indican que péptidos derivados del MC1R son procesados y presentados naturalmente por células de melanoma, por lo que los epítomos derivados de este receptor serían verdaderos antígenos melanoma-específicos (Salazar-Onfray F. y col., 1997) (Figura 2)

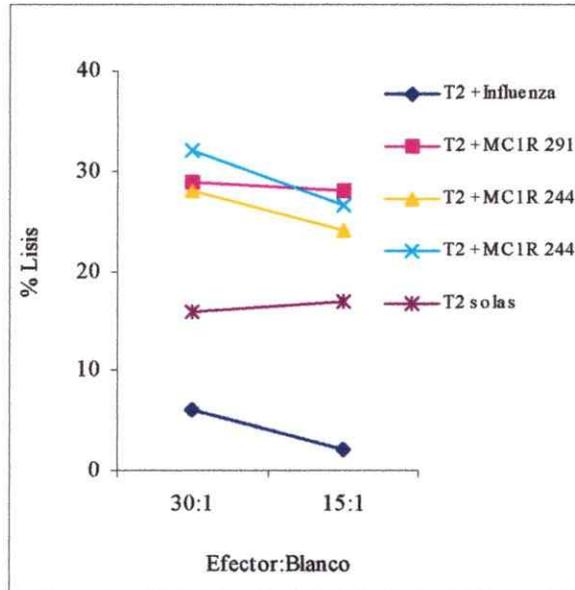
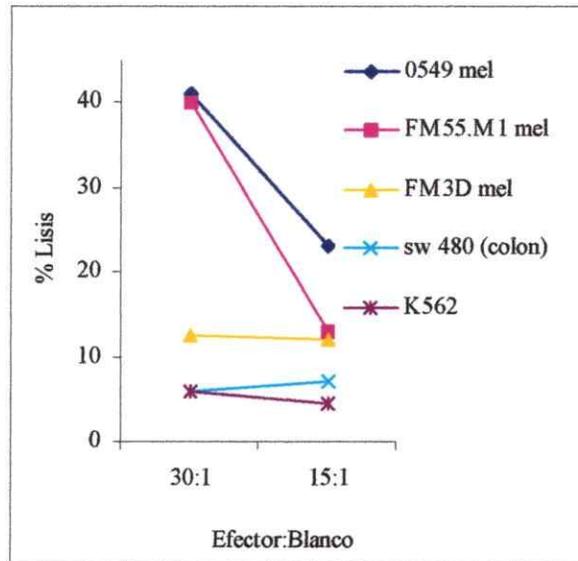
A**B**

Figura 2. Líneas de linfocitos T citotóxicos generadas por inmunología reversa reconocen específicamente células T2 cargadas con los péptidos derivados de MC1R (A) Linfocitos infiltrantes de tumor reconocen específicamente células derivadas del tumor autólogo y una línea celular de melanoma que expresa MC1R (B).

Estudios realizados en células del sistema inmune, especialmente monocitos, macrófagos y células dendríticas indican que la estimulación de estas células con citoquinas induce la expresión de MC1R en la membrana (Salazar-Onfray F., 2002, Bhardwaj RS. Y col., 1997). La posibilidad de utilizar en el futuro una inmunoterapia basada en MC1R, incluyendo la utilización de anticuerpos MC1R específicos modificados, depende de cuan selectivamente este receptor se exprese en melanomas con respecto a tejidos normales. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que MC1R es sobre-expresado en líneas y tejidos de melanoma cutáneo, sin embargo, este receptor se encuentra principalmente acumulado en el citoplasma de las células, aunque a diferencia de otros antígenos de melanoma, éste no se encuentra en los melanosomas (Xia Y. y col., 1996). Además, se ha demostrado que algunas citoquinas proinflamatorias pueden inducir la expresión de MC1R en la membrana plasmática de monocitos y macrófagos. Con estos antecedentes, en esta tesis se propuso la siguiente hipótesis: ***“MC1R se expresaría en líneas y tejidos de melanoma ocular y la expresión de esta molécula en la membrana celular, estaría regulada por citoquinas pro-inflamatorias”***

El objetivo general de esta tesis es evaluar la expresión de MC1R, en líneas y tejidos de melanoma ocular y la regulación por citoquinas de su expresión en membrana plasmática de líneas celulares de melanoma ocular.

Con el fin de evaluar la hipótesis planteada, nos propusimos varios objetivos específicos: Primero, se debió recolectar muestras de enucleaciones y biopsias de metástasis hepáticas para analizar las células de melanoma ocular primarias o metastásicas de éstos tejido e intentar establecer líneas celulares de melanoma ocular. Luego, se evaluó la expresión de MC1R en líneas celulares y tejidos derivados de melanoma ocular

mediante Western blot, Citometría de flujo, Inmunohistoquímica. También se estudió el efecto de algunas citoquinas en la inducción de la expresión de superficie de MC1R mediante citometría de flujo, con el fin de evaluar la posibilidad de regulación de la expresión de MC1R en la membrana plasmática de melanomas, para contribuir al rompimiento de la tolerancia del sistema inmune a antígenos tumorales en una posible una terapia basada en anticuerpos. Por último, se aislaron células NK a partir de células mononucleares de sangre periférica y se evaluó la sensibilidad de líneas de melanoma ocular tratadas con citoquinas a la lisis por células NK mediante ensayos de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC).

HIPOTESIS

Basado en estudios anteriores sabemos que MC1R se expresa en la mayoría de los melanomas cutáneos y que su expresión en estas células se localiza principalmente a nivel citoplasmático. En esta tesis nosotros planteamos que **MC1R se expresa en líneas y tejidos de melanoma ocular y la expresión de esta molécula en la membrana celular, está regulada por citoquinas pro-inflamatorias**

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de MC1R, un antígeno asociado a melanoma, en líneas y tejidos de melanoma ocular y estudiar la regulación por citoquinas de su expresión en membrana plasmática.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Recaudar muestras de enucleaciones y biopsias de metástasis hepáticas para analizar las células de melanoma ocular primarias o metastásicas de éstos tejidos e intentar establecer líneas celulares de melanoma ocular.
2. Evaluar la expresión de MC1R en líneas celulares y tejidos derivados de melanoma ocular mediante Western blot, citometría de flujo, inmunohistoquímica.
3. Estudiar el efecto de citoquinas en la expresión de superficie de MC1R mediante

citometría de flujo.

4. Aislar y caracterizar células NK desde células mononucleares de sangre periférica.
5. Evaluar la sensibilidad de líneas de melanoma ocular tratadas con citoquinas pro-inflamatorias a la lisis por células NK mediante ensayos de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC).

2. MATERIALES

2.1 Reactivos Generales

Tubos cónicos 15 y 50 ml, crioviales 1 ml, placas de cultivo 6 pocillos, placas petri; FALCON, Becton-Dickinson, USA.

Azul de Tripán, Tween20 se obtuvieron de Merck, Darmstadt.

Isotiocianato de fluoresceína (FITC) Dako, Dinamarca.

Metanol, etanol, Xilol; TCL Ltda, Chile.

Membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P; Milipore Corp., Bedford, MA.

Paraformaldehído, Isopropanol, Marcador de peso molecular preteñido de proteína. Winkler, Ltda. Santiago Chile.

DMSO, Digitonina. Sigma, St Louis, MO.

RPMI-1640 Penicilina/estreptomina, L-glutamina, tripsina, suero fetal bovino, BSA, EDTA; Gibco BRL, Gaithersburg, NY, EEUU.

ECLTM Western blotting analysis system, Cromo radioactivo; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra.

Ficoll-Histopaque. Axis-Shield, Oslo, Noruega.

AIMV, Therapeutic serum-free medium, Gibco, BLR

Permanganato de potasio; SUDELAB, Santiago, Chile.

Kit de selección negativa de células NK. Dynal-Biotech.

Citoquinas recombinantes humanas, IL-2, IL-12, IFN- γ ; USBiological, USA.

2.2 Equipos

Citómetro de Flujo FACSScan, Becton Dickinson, USA.

Centrífuga eppendorf modelo 5810R, Hamburg, Germany.

Microscopio Leica microsystems, Wetzlar GMBH, Germany.

Cámara digital Olympus Camedia C-5050 5,0 megapixels, Japan.

PACKARD modelo Packard Cobra II Gamma Counter, Perkin-Elmer, USA.

3. METODOS

3.1 Líneas celulares

Las líneas celulares de melanoma primario ocular humano OCM1 y OCM3 fueron establecidas por el Dr. Flavio Salazar en el Instituto Karolinska. C1R-A2 es una línea celular deficiente para la expresión de la molécula de histocompatibilidad de clase I (MHC clase I) y que ha sido transfectada con la molécula HLA-A2. FM55 es una línea celular derivada de una metástasis de melanoma cutáneo humano, gentilmente donada por el Dr. J. Zeuthen, Cancer Society, Copenhagen. Las células de melanoma ocular OCM4, OCM5 y OCM6 fueron obtenidas en el Programa Disciplinario de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Como controles, se utilizaron las líneas celulares C1RA2 para ver la especificidad de la expresión de MC1R y K562, prototipo celular sensible a la lisis mediada por células Natural Killer (NK). Para los ensayos de citotoxicidad, las líneas celulares de melanoma fueron mantenidas en un ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado con 5% (V/V) de suero fetal bovino (SFB), y con una mezcla de antibióticos (penicilina 100U/l, estreptomina 100 µg/ml) y L-glutamina, 1mM.

3.2 Congelamiento y descongelamiento de células

Las células fueron lavadas al menos 2 veces con PBS 1X pH 7,0 (KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHPO₄ 0,6 mM) antes de ser resuspendidas en un medio de congelación constituido por 90% de SFB y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación, las células fueron

colocadas a -80°C en crioviales dentro de una cámara de congelación que contenía isopropanol. Esto permite un descenso gradual de la temperatura de los crioviales, disminuyendo la tasa de mortalidad causada por los procesos de congelación y descongelación. Los crioviales fueron posteriormente traspasados a un estanque de nitrógeno a -196°C .

Las células que habían sido mantenidas en crioviales en nitrógeno líquido fueron descongeladas en agua a 37°C . Luego de lavar rápidamente las células con 2 ml de RPMI 10% SFB y tres veces con 5 ml del mismo medio de cultivo, se evaluó la viabilidad de las células mediante la tinción con Azul de Tripán. Utilizando este método, se logró obtener en todos los casos una viabilidad celular mayor al 95%.

3.3 Establecimiento de líneas celulares de melanoma ocular a partir de biopsias provenientes de enucleaciones

Melanomas oculares primarios frescos fueron obtenidos a partir de biopsias provenientes de enucleaciones desde el Servicio de oftalmología del Hospital Salvador. Estas muestras fueron colocadas en un tubo cónico de 50 ml con PBS estéril. Posterior a esto, los tumores se colocaron en una placa de Petri, se eliminó el PBS y luego se agregaron nuevamente 10 ml de PBS. El tumor fue disgregado mecánicamente y el caldo tumoral obtenido fue puesto en un tubo cónico de 50 ml que contenía 40 ml de PBS. La mezcla se lavó 3 veces, centrifugando a 1200 rpm por 5 min. Se contaron las células tumorales obtenidas y se sembraron 1×10^6 células tumorales en placas de cultivo de 6 pocillos con 3 ml de medio de cultivo RPMI 10% de SFB. En algunos casos, se adicionó

Ciclosporina A, a una concentración de 1µg/ml para evitar la proliferación de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en el cultivo celular.

3.4 Citometría de flujo

Las células fueron despegadas de la botella de cultivo utilizando PBS-EDTA (KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHPO₄ 0,6 mM, EDTA disódico 0,2 g/L, pH 7,0), lavadas tres veces con PBS 1X y luego fijadas incubando 10 min. con PBS-paraformaldehído 2%. A continuación, 3 x 10⁵ células fueron incubadas por 30 min. en una placa de 96 pocillos fondo V con 2 µg/ml del AcMo MP1-1C11 (anti-MC1R). Las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X e incubadas otros 30 min. con un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). Un grupo de células fue incubado únicamente con el anticuerpo secundario para obtener los valores de fluorescencia atribuidos a la unión inespecífica de este anticuerpo. Después de la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y luego fijadas nuevamente con PBS-paraformaldehído 2% SFB 0,1% y guardadas a 4°C en oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Para analizar la expresión intracelular, después de ser fijadas con paraformaldehído, las células fueron permeabilizadas con digitonina 2% en PBS 1X por 10 min. a temperatura ambiente antes de iniciar la tinción. Después de chequear la permeabilidad de las células con Azul de Tripán, éstas se incubaron con los siguientes anticuerpos dependiendo del experimento: MP1-1C11 (2µg/ml), MP4-1B7 (10µg/ml), ambos anti MC1R; 2 µg /ml del AcMo 9.2.27 específico para el marcador de melanoma (Bumol T.F., Reisfeld R.A.,

1981) La tinción basal fue evaluada incubando por 30 min. a 4°C sólo con el anticuerpo secundario.

3.5 Análisis de Inmunohistoquímica en cortes desparafinados

La inmunotinción fue realizada utilizando la técnica ABC-estándar. Cortes de tejidos fueron desparafinados en Xilol y rehidratados utilizando una escala descendente de etanol. Aquellos cortes que poseían una intensa pigmentación fueron sometidos a un blanqueamiento de melanina en una solución de permanganato de potasio al 0,05% durante 1 a 2 horas y luego revelados en una solución de ácido oxálico 1% hasta la desaparición de la pigmentación. Después de 2 lavados con PBS 1X, la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min. Luego, los cortes fueron incubados con un suero bloqueador (PBS-BSA 1%) por 30 min. El exceso de suero bloqueador fue drenado y se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios (MP4-1B7 anti-MC1R, anti-S100, HMB-45, y Melan-A) a una concentración de 10 µg/ml. Todas las incubaciones fueron realizadas durante toda la noche a 4° C en una cámara húmeda. Al otro día, las muestras fueron lavadas 3 veces por 5 min. con PBS y luego incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-ratón biotinilado. Se repitió el lavado y se aplicó el complejo estreptavidina-peroxidasa por otros 15 min. La reacción peroxidasa fue llevada a cabo utilizando 3,3-diaminobenzidina (0,6 mg/ml de tetrahidrocloruro de diamino-benzidina en peróxido de hidrógeno al 0.03%) por 6 min. La expresión de la proteína MC1R y los demás marcadores de melanoma fue evaluada de acuerdo a una escala arbitraria: -, +/-, + basado en la intensidad de la

inmunoreactividad.

3.6 Análisis Inmunocitoquímico

La inmunotinción fue realizada utilizando líneas celulares de melanoma. Estas células fueron sembradas en portaobjetos estériles hasta lograr la adherencia propia de éstas células. A continuación, las preparaciones fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con metanol frío 100% a 4°C por 10 min. para luego iniciar la tinción inmuno-específica descrita anteriormente.

3.7 Preparación de extracto proteico

Células C1RA2, OCM1, OCM3, OCM5 y FM55 fueron sembradas en placas de 6 pocillos en medio RPMI 1640 5% SFB a 37°C hasta alcanzar confluencia. Las células fueron liberadas de la placa de cultivo incubando con PBS-EDTA por 10 min. a 37 °C, para luego ser centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. a temperatura ambiente.

Las células obtenidas fueron resuspendidas en PBS 1X y contadas mediante el método de exclusión por Azul de Tripán. Posteriormente, se agregó 100 µL de tampón de lisis (Tris 65mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 1%) por cada 1×10^6 células. Las muestras fueron incubadas por 15 min. a temperatura ambiente y sonicadas con 10 micron por 30 segundos. Finalmente, las muestras se calentaron por 5 min. a 100°C, y se analizaron por SDS-PAGE.

3.8 Western blot

Las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% en condiciones denaturantes. En cada carril se cargaron 30 μ L de muestra (100 μ L de tampón de lisis/ 1×10^6 células). Las proteínas fraccionadas fueron electrotransferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y bloqueadas con PBS-leche al 5% durante toda la noche a 4°C. Después de lavadas con PBS-Tween20 al 0.05%, las membranas fueron incubadas con los AcMo anti-MC1R (MP1-B7) (3 μ g/ml) y anti- β actina (dilución 1:3000) por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas nuevamente con PBS-Tween20 al 0.05% y luego incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón POD (1:2500) por 2 horas a temperatura ambiente. La inmunodetección se desarrolló mediante ensayo de quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial ECL para Western blot.

3.9 Inducción de expresión en membrana plasmática de MC1R en líneas de melanoma ocular

Se sembraron 6×10^5 células de las líneas celulares OCM1 y OCM3 por pocillo en una placa de 6 pocillos en 3 ml de RPMI 5% SFB. Después de 4 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio AIM-V, libre de suero fetal bovino. Al cabo de 12 horas, se estimularon las células con distintas citoquinas; IFN- γ (500U/ml), TNF- α (1ng/ml), IL-4 (500U/ml) y MSH- α (10^{-9} M). Para el experimento de cinética de expresión de MC1R en la membrana plasmática las células fueron despegadas con PBS-EDTA 1X y fijadas con PBS-paraformaldehído 2% a distintos tiempos de 1, 2, 4, 8 y 24 horas. En otros

experimentos de expresión las células fueron fijadas a las 4 horas de ser incubadas con citoquinas.

3.10 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica a partir de concentrados leucocitarios de donantes normales

Concentrados de leucocitos de donantes normales (buffy coat) de 50 ml donados por el Banco de Sangre del Hospital San José, fueron diluidos con 100 ml de PBS estéril 1X. La banda de células mononucleares de sangre periférica fue separada mediante un gradiente de Ficoll-Histopaque y transferida a un nuevo tubo. Luego de tres lavados con 40 ml de PBS 1X, los glóbulos rojos fueron lisados incubando las células con búfer ACK (NH_4CL 0,15M, KHCO 10mM, Na_2EDTA 0,1mM) por 5 min. a temperatura ambiente. Después de ser centrifugadas por 5 min. a 1200 rpm., las células fueron nuevamente lavadas con PBS 1X y posteriormente contadas utilizando Azul de Tripán. Se sembraron 30×10^6 de PBMC en 3 ml de RPMI 10 % SFB por pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se recolectaron las células no adherentes, principalmente linfocitos de sangre periférica, población celular que fue posteriormente enriquecida de células NK, como se describe a continuación.

3.11 Aislamiento de células Natural Killer (NK) a partir de linfocitos de sangre periférica

Para enriquecer el cultivo celular de células NK, se usó un protocolo que utiliza partículas magnéticas de poliestireno; las que se unen a anticuerpos específicos contra moléculas expresadas por células no deseadas que se encuentran presentes en cultivos de linfocitos de sangre periférica.

La población de linfocitos fue resuspendida a una concentración de 1×10^7 células por cada 100 μl de PBS-0,1% BSA. A continuación, se agregaron 20 μl de suero fetal bovino descomplementado por 20 min. a 56°C y 20 μl de una mezcla de anticuerpos específicos contra CD3, CD14, CD36, CDw123 y HLA clase II DR/DP. Se dejó incubando por 20 min. a 4°C con agitación leve. Al cabo de este tiempo, se lavaron las células con 1 ml de PBS-BSA 0,1% y se centrifugó por 8 min. a 500 g. Luego de remover el sobrenadante, se resuspendieron las células en 0,95 ml de PBS- BSA 0,1%. A continuación, se agregaron 50 μl de una solución que contenía 4×10^8 microesferas magnéticas/ml y se dejó incubando por 20 min. a 4°C. Luego de lavar con 500 μl de PBS-BSA 0,1%, se acercó el tubo a un magneto por 2 min., quedando adheridas a éste las células que se encontraban unidas al complejo "anticuerpo-microesfera". El sobrenadante fue recuperado y trasladado a un nuevo tubo que contenía otros 50 μl de la misma solución de microesferas utilizada anteriormente. Se incubó por 20 min. a 4°C y se repitió el proceso anterior utilizando un magneto, con lo que se obtuvo una población enriquecida de células NK.

3.12 Cultivo de células NK

La población celular enriquecida de células NK fue cultivada en placas de 6 pocillos a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml en 4 ml de medio RPMI 10% SFB más 1000 U/ml de IL-2 y 100 ng/ml de IL-12. El medio de cultivo con citoquinas fue reemplazado periódicamente dependiendo de la morfología de las células del cultivo, hasta obtener una población celular con morfología semejante a linfocitos activados, momento en que se procedió a congelar las células hasta su utilización.

3.13 Ensayo de citotoxicidad mediada por anticuerpos

Células OCM1 fueron marcadas radiactivamente con 100 μ l de Cr^{51} (μ Cu/ml) en PBS 1X y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las células marcadas fueron lavadas 4 veces con PBS 1X. A continuación, las células fueron incubadas por 30 min. a 4 °C con un AcMo anti MC1R (MP1C11) o un anticuerpo irrelevante. Después de 2 lavados con PBS 1X, 5000 células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos fondo V junto con la población de células NK obtenida anteriormente en un volumen total de 200 μ L. Se utilizaron 4 relaciones efector:blanco (30:1, 15:1, 8:1 y 4:1) y se incluyeron pruebas de emisión espontánea y máxima. La línea celular K562, sensible a la actividad NK, fue utilizada como control. Después de 6 horas de incubación a 37°C, 100 μ l de cada pocillo de sobrenadante fueron recolectados del ensayo citotóxico y su actividad se determinó utilizando un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: $\% = 100 \times ((\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}))$.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la expresión de MC1R en líneas celulares de melanoma ocular mediante Western blot

Con el fin de visualizar la presencia y expresión de MC1R en líneas celulares de origen uveal, extractos celulares de células OCM-1, OCM-3 y OCM-5, así como FM55 (control positivo) y C1RA2 (control negativo) fueron analizados mediante Western blot. De esta manera, los extractos celulares de las líneas estudiadas fueron marcadas con el AcMo MP1.1B7 anti-MC1R. Un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa y el sistema ECL fueron utilizados para la detección de la proteína, como se describe en métodos.

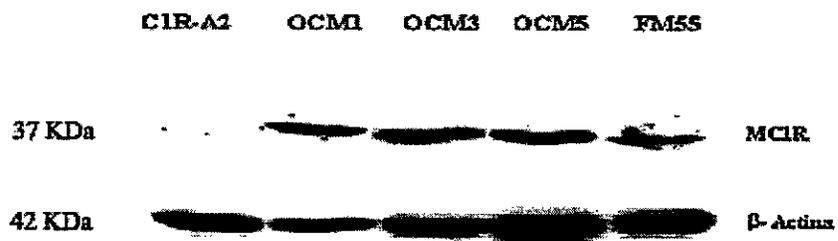


Figura 3. Detección de la proteína MC1R en células de melanoma de origen uveal mediante Western blot. Las muestras se analizaron como se describe en métodos y luego incubadas con el AcMo anti-MC1R o anti-B actina. Posteriormente fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-ratón POD. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado mediante el ensayo de quimioluminiscencia utilizando para ello el sistema comercial ECL.

Del análisis de la Figura 3, se observa que todas las líneas celulares de origen uveal expresan MC1R, en niveles comparables a los detectados para FM55 (control positivo), observándose un notable incremento en la banda inmunoreactiva de 35 kDa que corresponde a este receptor. Como se esperaba, la línea celular C1RA2 no expresa MC1R.

4.2 Detección de MC1R en tejidos frescos de melanoma ocular utilizando citometría de flujo.

Una vez detectada la presencia de MC1R en líneas celulares de melanoma ocular a través de Western blot, se procedió a realizar un análisis de expresión de MC1R en células de melanoma aisladas de tumores frescos, utilizando citometría de flujo. Para esto, las células fueron permeabilizadas para luego ser incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-MC1R seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado con FITC. Finalmente, las células fueron analizadas a través de citometría de flujo. Como control, las células fueron incubadas únicamente con el anticuerpo secundario (FITC control) Todas las líneas celulares provenientes de tumores frescos de melanoma ocular sobre-expresan MC1R a nivel intracelular comparado con la línea celular control utilizada en el experimento (C1RA2) (Figura 4)

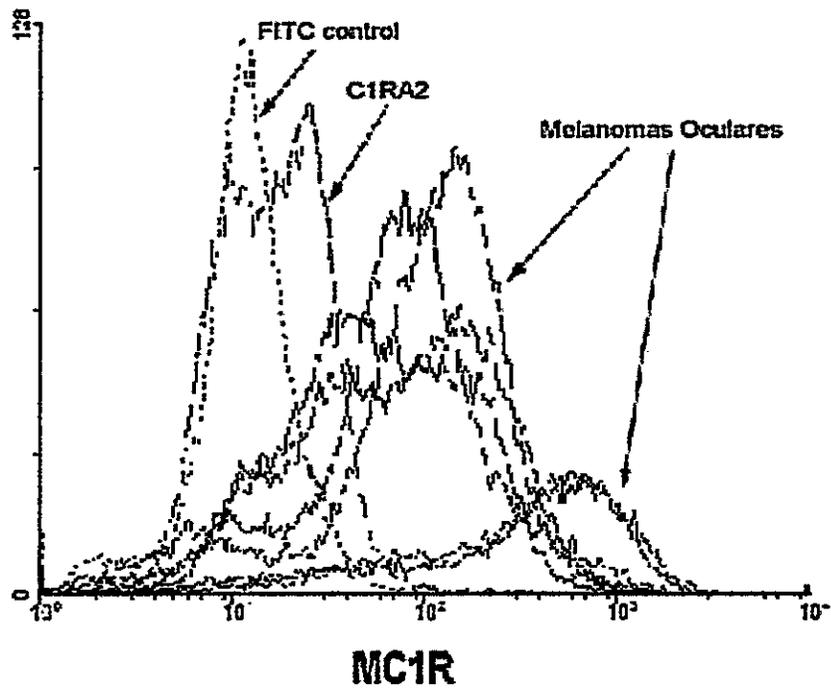


Figura 4. Células de tejidos frescos de melanoma ocular expresan MC1R.

Las células fueron fijadas, permeabilizadas y analizadas utilizando citometría de flujo. FITC control corresponde a una línea celular incubada sólo con un anticuerpo secundario conjugado con FITC.

4.3 Estudio de la expresión de MC1R en tejidos de melanoma ocular desparafinados a través de inmunohistoquímica.

Considerando estudios previos que indican que las células de melanoma ocular poseen diferentes patrones de expresión de marcadores de superficie comparado con células de melanoma cutáneo, se realizó un análisis más profundo de expresión de MC1R utilizando un panel de tejidos parafinados de melanoma ocular y tejidos controles y se comparó la frecuencia de expresión con marcadores utilizados actualmente en el diagnóstico del melanoma uveal.

Cortes parafinados de tejidos de melanoma ocular o nevus normales fueron analizados para la expresión de MC1R como se describe en materiales y métodos. Una tinción específica intensa fue detectada en la mayoría de los melanomas oculares primarios analizados (Tabla 1). Los resultados de la inmunohistoquímica fueron evaluados de acuerdo a una escala arbitraria: -, +/-, +, basado en la intensidad de la inmunoreactividad. La proteína MC1R fue detectada en 17 de 18 tejidos de melanoma testeados (95%), incluyendo una metástasis hepática. Dos nevus normales resultaron negativos para los tres anticuerpos y un melanoma cutáneo fue teñido con los tres AcMo utilizados (Tabla 1).

Tejido	S100	HMB-45	MART-1	MC1R
Melanoma Ocular 2767	-	+	nd	+
Melanoma Ocular 2892	-	-	nd	+
Melanoma Ocular 3841	-	+	nd	+/-
Melanoma Ocular 3802	-	+	+	+
Melanoma Ocular 3795	-	nd	nd	+
Melanoma Ocular 1260	-	-	nd	+
Melanoma Ocular 2736	+	nd	nd	+
Melanoma Ocular 2862	-	nd	nd	+
Melanoma Ocular 3054	+	+	+	+
Melanoma Ocular 3469	-	-	nd	+
Melanoma Ocular 3839	-	+	-	+
Melanoma Ocular 3784	+	+	+	+
Melanoma Ocular 2858	+	+	+	+
Melanoma Ocular 2040	+	+	-	+
Melanoma Ocular 3715	-	+/-	nd	+
Melanoma Ocular 2890	nd	nd	nd	+
Melanoma Ocular 2889	nd	nd	nd	+
Melanoma cutáneo primario 5530	+	+	nd	+
Nevus pigmentario 6643	-	-	nd	-
Nevus pigmentario 2815	-	-	nd	-

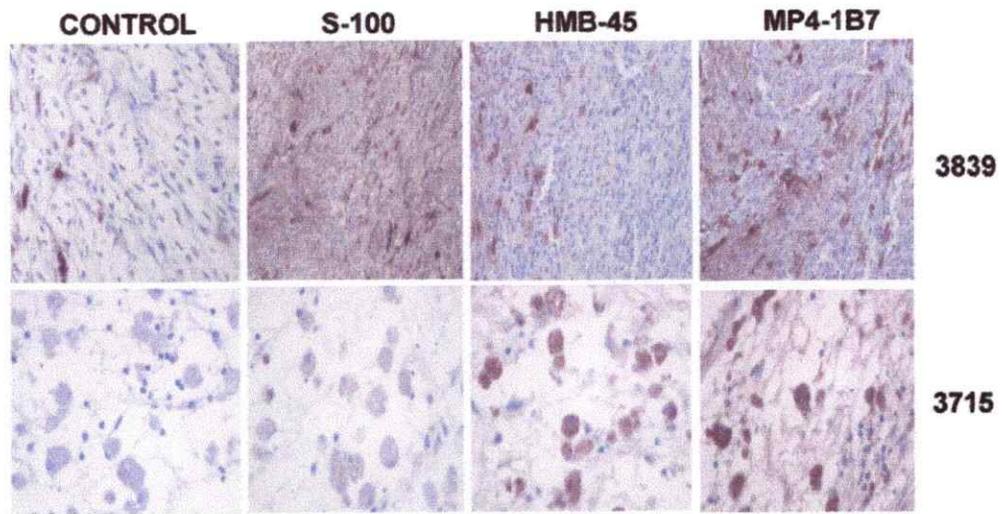
Tabla 1. Expresión de MC1R en tejidos de melanoma ocular

Diecisiete tejidos de melanoma ocular, un melanoma cutáneo y dos nevus pigmentarios fueron analizados por inmunohistoquímica utilizando tres anticuerpos de diagnóstico de melanoma y un anticuerpo anti- MC1R. Los resultados fueron interpretados mediante una escala arbitraria según la intensidad de la inmunoreacción.

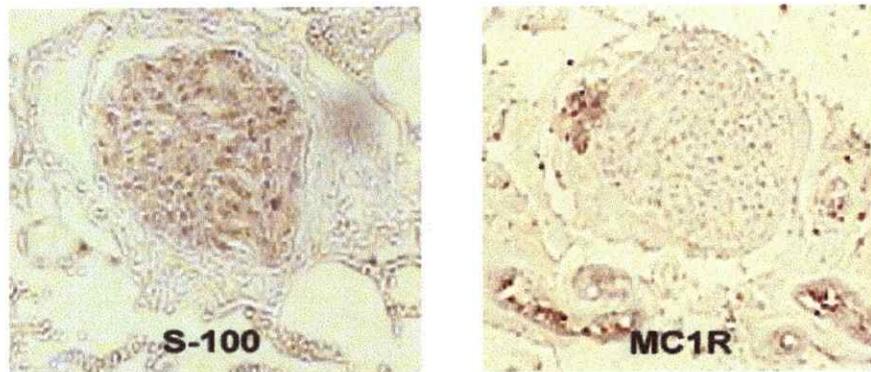
nd=no determinado

La expresión de MC1R en los melanomas oculares fue homogénea y en la mayoría de las muestras analizadas se observó una inmunoreactividad más intensa comparada con la obtenida utilizando otros marcadores de melanoma (Figura 5A y 5B). Al contrario, los tejidos normales adyacentes, incluyendo tejido conectivo y epitelial resultaron negativos.

A



B



C

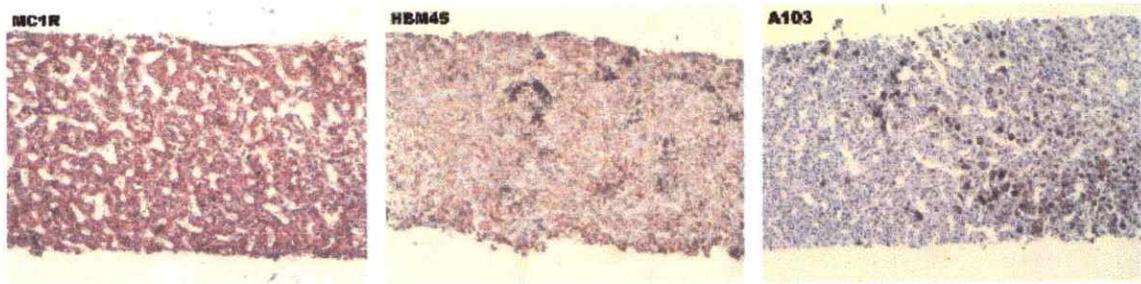


Figura 5. MC1R es homogéneamente detectado en tejidos frescos de melanoma ocular primario y metastásico

A) Cortes parafinados de tejidos de melanoma ocular fueron teñidos con un anticuerpo control anti-IgG, un AcMo anti-S-100, un AcMo anti-HBM45 y con el AcMo MP4-1B7 (anti-MC1R), seguido por un AcMo anti-Ig biotinilado.

B) Tejido nervioso presente en el tejido ocular fue reconocido por el AcMo anti S-100, pero no por el AcMo MP4.1B7.

C) Cortes parafinados de una metástasis hepática de melanoma ocular fue teñida con los siguientes AcMo: A103 (anti-Mart1), HBM45 (anti-gp100) y MP4-1B7 (anti- MC1R).

En cuanto a la especificidad, se observó que el AcMo anti-MC1R no tiñó terminales de tejido nervioso, presente normalmente en el tejido ocular, a diferencia del anticuerpo anti S-100, que presentó una reacción cruzada con estos tejidos (Figura 5B). También se observó que MC1R es altamente expresado también en tejidos de metástasis hepática de melanoma comparado con otros marcadores presentes en este tejido (Figura 5C)

Por otra parte, el anticuerpo HMB-45, que reconoce la proteína gp100 reconoció un 66% (8/12) de los melanomas analizados. Además, se observó que la sensibilidad para S100 es menor en melanoma ocular que en melanoma cutáneo. S100 fue detectado sólo en un 33% (5/15) de las muestras analizadas. El anticuerpo anti-MART-1/Melan-A (A103) reconoció 4 de 6 tejidos de melanoma ocular (Tabla 1).

4.4 Inducción de expresión en membrana plasmática de MC1R en líneas de melanoma ocular.

Las líneas celulares de melanoma ocular OCM1 y OCM3 fueron incubadas con distintas citoquinas con el fin de evaluar la influencia de éstas en la expresión en membrana plasmática de MC1R. El cuadro superior izquierdo de la Figura 6 muestra la expresión en membrana y total de MC1R en condiciones normales (medio). Para los demás histogramas, se observa que sólo una parte de la población celular analizada, expresa altos niveles de MC1R en su superficie, mientras el resto de la población presenta bajos niveles de este receptor. Al incubar con las citoquinas nombradas en la figura, la proporción de células que presenta MC1R a nivel extracelular aumenta

considerablemente con respecto al control. La citoquina que mayor aumento provocó en la expresión extracelular de MC1R fue IFN- γ , por lo que ésta fue elegida para los siguientes experimentos de inducción de la expresión extracelular de MC1R.

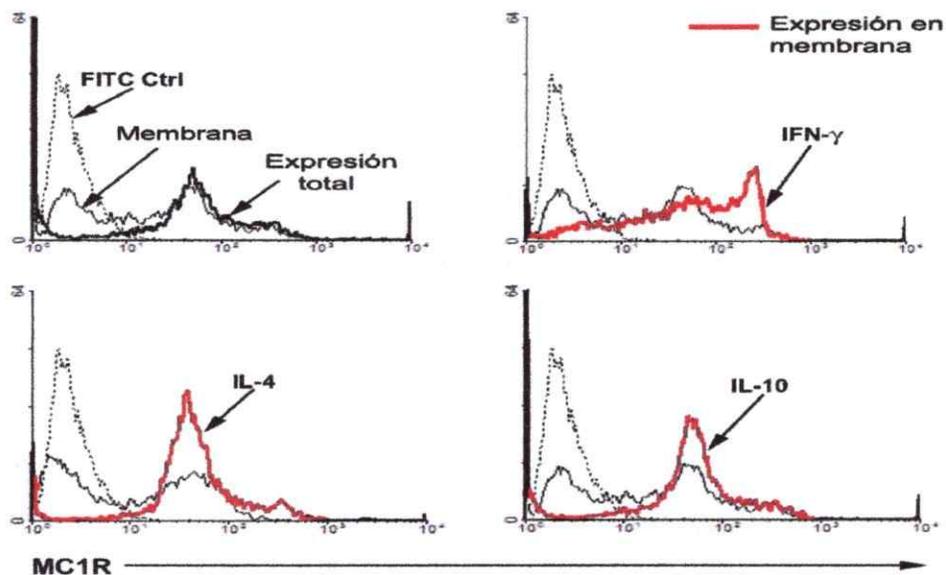


Figura 6. La expresión en superficie de MC1R es aumentada por citoquinas pro-inflamatorias en melanoma ocular

Dos líneas celulares de melanoma ocular (OCM1 y OCM3) fueron incubadas con citoquinas: IFN- γ (500 U/ml), TNF- α (1 ng/ml), IL-4 (500U/ml) ó α -MSH (10^{-9} M) y luego teñidas con un AcMo anti MC1R (MP1,1C11) y finalmente analizadas por citometría de flujo. En la figura se muestran los histogramas obtenidos mediante el tratamiento de la línea OCM1.

A continuación, se realizó una cinética de expresión de MC1R en la línea celular OCM1 para determinar el tiempo donde se obtenía la mayor inducción en membrana de MC1R. Las células fueron incubadas con IFN- γ y fijadas a distintos períodos de tiempo. Luego, se realizó una tinción utilizando el AcMo anti-MC1R y se analizaron las muestras mediante FACS. Los histogramas muestran el porcentaje de células de la población de esta línea celular que expresa MC1R. Utilizando la muestra incubada sólo con el anticuerpo secundario, se determinó una región M1, que corresponde a la zona de fluorescencia atribuida a una unión específica del anticuerpo secundario acoplado con FITC con el AcMo anti-MC1R. Utilizando este análisis, se observa que en condiciones normales (medio), aproximadamente un 46% de las células expresa MC1R en la membrana plasmática. A medida que avanza el tiempo, se observa un aumento en el porcentaje de células de la población que presenta el receptor en su membrana, llegando a un máximo de expresión a las 4 horas, donde se observa aproximadamente un 86% de células positivas (Figura 7)

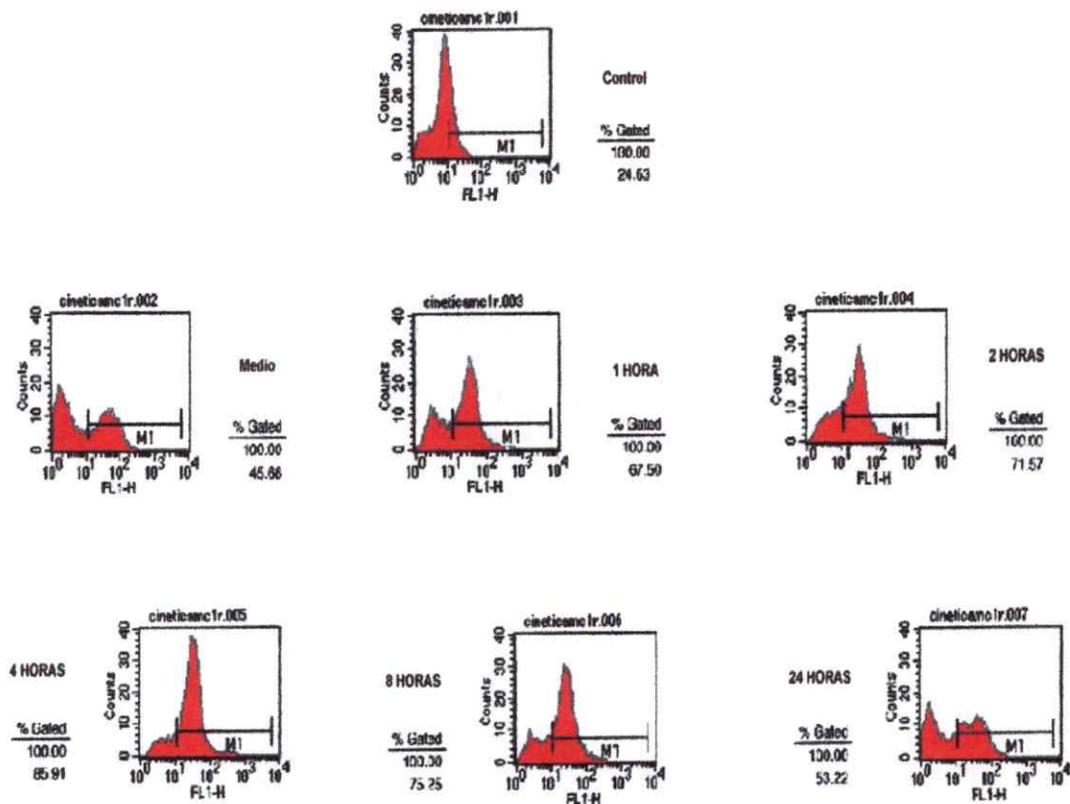


Figura 7. Cinética de expresión de MC1R en la membrana plasmática de melanoma ocular después de tratamiento con citoquinas.

Células de la línea celular OCM1 fueron incubadas con IFN- γ por diferentes periodos de tiempo y a continuación teñidas con un anticuerpo monoclonal anti MC1R y finalmente analizadas por citometría de flujo.

4.5 Separación y caracterización de células NK de linfocitos de sangre periférica

La sensibilidad de las células de melanoma ocular a la lisis mediada por anticuerpos fue realizada utilizando como células efectoras, células Natural Killer (NK). Estas fueron aisladas de linfocitos de sangre periférica mediante depleción negativa utilizando partículas magnéticas. La presencia de células NK en el cultivo fue evaluada mediante tinción con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD56. En la figura se observa que antes de la separación, existía una mezcla de poblaciones celulares, principalmente linfocitos. A su vez, la proporción de células NK fue bastante baja (Figura 8, izquierda). Una vez realizada la separación, las células obtenidas fueron aproximadamente 90% NK (Figura 8, derecha). Después de incubar por 4 días estas células con medio suplementado con IL-2 e IL-12, las células presentaron una morfología similar a la de linfocitos activados.

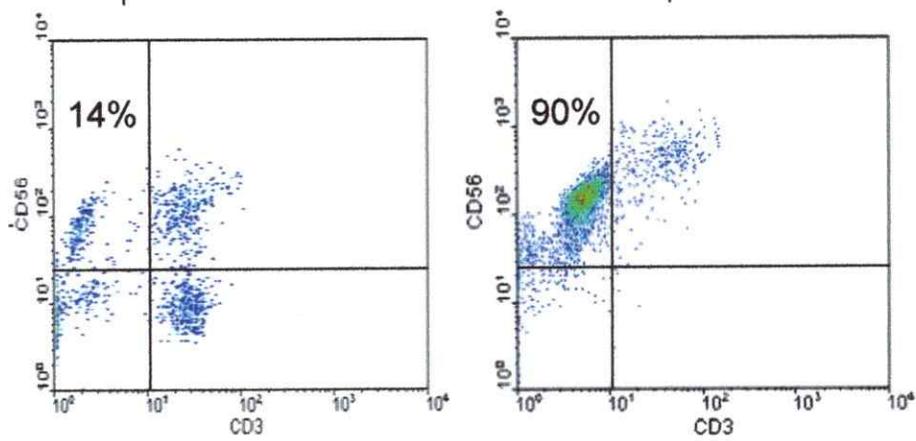


Figura 8. Caracterización de células en cultivo antes y después de separación con beads
 Las células fueron fijadas y teñidas para los marcadores CD3 y CD56 antes y después de la separación con beads. La población enriquecida en células NK fue cultivada con 1000 U/ml de IL-2 y 15 ng/ml de IL-12 por 5 días.

4.6 Ensayo de citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC)

Para evaluar si el aumento en la expresión de MC1R en la membrana plasmática de las células de melanoma ocular se encontraba afectando la sensibilidad de estas células a la lisis mediada por anticuerpo (ADCC), se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad en el que se utilizaron como células efectoras la población enriquecida en células NK obtenida anteriormente. Se utilizó la línea celular OCM1 con o sin estímulo de IFN- γ , e incubadas con un el AcMo anti-MC1R o un anticuerpo irrelevante. Como control positivo de lisis, se incluyó en el experimento la línea celular K562, sensible a la actividad NK. Los resultados del ensayo citotóxico graficados en la Figura muestran que no existe diferencia de lisis específica entre las células que fueron incubadas con el anticuerpo anti-MC1R o el anticuerpo irrelevante. La incubación previa de estas células, aunque produjo el aumento de MC1R en la membrana, no aumentó la sensibilidad de estas células a la lisis específica mediada por células NK. Al contrario, la línea celular K562 resultó ser sensible a la población celular enriquecida en células natural killer utilizada en este experimento (Figura 9).

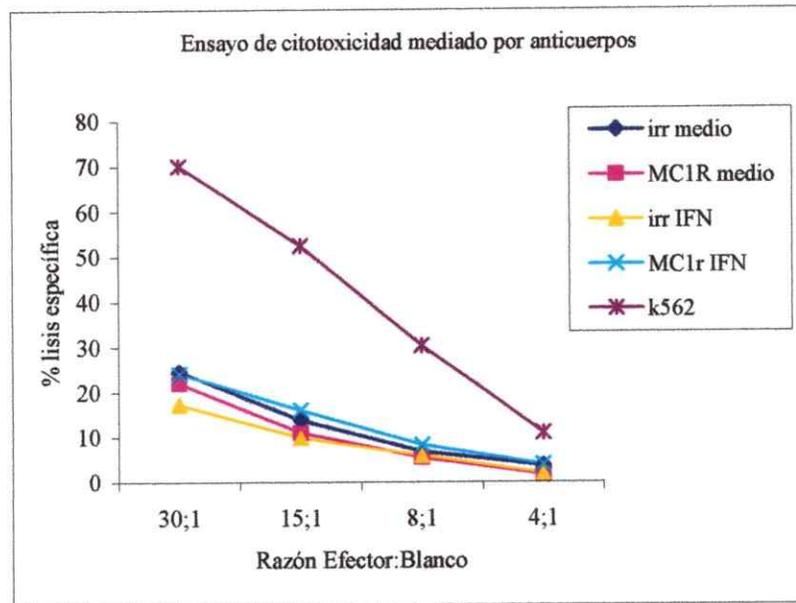


Figura 9. Ensayo de citotoxicidad mediado por células dependientes de anticuerpos (ADCC)

Las células OCM1 fueron estimuladas con IFN- γ por 4 horas, incubadas con un AcMo anti-MC1R o irrelevante y luego enfrentados a una población de células NK. Se utilizó como control de lisis la línea celular K562. El gráfico muestra los porcentajes de lisis específica.

5. DISCUSION

En esta tesis se estudió la sobre-expresión del receptor de Melanocortina 1 (MC1R) en melanoma ocular, así como su expresión regulada por citoquinas. Se demostró que, utilizando un anticuerpo monoclonal, MC1R puede ser detectado en tejidos frescos y líneas celulares de melanoma ocular. Más aún, MC1R es detectado más frecuentemente que otros marcadores de melanoma utilizados actualmente en ensayos de histopatología. En líneas celulares de melanoma ocular se demostró que la expresión de MC1R en la membrana celular puede ser regulada por citoquinas, especialmente IFN- γ .

El melanoma uveal es el cáncer intraocular más frecuente en adultos, y en la totalidad de los casos el único tratamiento disponible es la enucleación. Este tumor constituye un ejemplo de neoplasias que se desarrollan en sitios de privilegio inmune (Goodall, 1994), lo que implica un desafío mayor para futuras inmunoterapias.

Entre los antígenos asociados a melanoma descritos se encuentra el Receptor de Melanocortina 1 (MC1R) MC1R es un receptor acoplado a proteína G que fue descrito originalmente en melanomas y melanocitos (Xia, 1996), aunque también se ha encontrado presente en otros tipos celulares como queratinocitos y monocitos humanos. Es una proteína de 37 kDa que se encuentra localizada tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma (Chakraborty, 1991) y se ha descrito que es altamente afín a su ligando natural, la hormona estimulador de melanocitos α (α -MSH), potente estimulante de la pigmentación y diferenciación de células pigmentadas, incluyendo a las células de melanoma.

Anteriormente, nuestro grupo demostró que péptidos derivados de MC1R pueden generar LTC péptido-específicos que reconocen a MHC clase I en líneas de melanomas (Salazar-Onfray, F. 1997) y que este receptor se encuentra sobre-expresado en melanomas cutáneos primarios y sus metástasis, demostrándose que MC1R se encuentra presente en el 80% de las líneas de melanoma estudiadas, pero no en otras líneas tumorales analizadas como carcinoma (Salazar-Onfray, F. 2002). Además, se detectó: una fuerte expresión de MC1R en todos los melanomas primarios (N=12) y metastásicos (N=11) analizados, bajos niveles de expresión en varios otros tejidos que incluyen la médula adrenal y cerebelo y además de un alto nivel de expresión en líneas celulares de melanoma comparado con melanocitos normales (Salazar-Onfray, F. 2002), lo que está de acuerdo con resultados de otros autores que señalan que aunque MC1R está sobre-expresado en melanomas, también está presente en ciertos tejidos normales, tales como testículos, ovarios y placenta, sin embargo con un menor nivel de expresión (Thornwall, M. 1996)

Basados en el hecho que MC1R se expresa mayoritariamente en melanomas primarios y metastásicos, y que el potencial uso de MC1R en inmunoterapias contra el melanoma podría depender de la expresión diferencial de este receptor en tejidos malignos versus tejidos normales, se evaluó la expresión de MC1R ahora en tejidos y líneas celulares de melanoma uveal, utilizando un anticuerpo específico para MC1R.

Con el fin de estudiar la expresión de MC1R en este tipo de melanoma, se realizaron estudios de inmunohistoquímica en cortes histológicos de tejidos de melanoma ocular (utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido a la porción extracelular de MC1R),

detectando una fuerte expresión de éste receptor en el 95% (17/18) de los melanomas uveales analizados, la que resultó bastante mayor que la expresión de otros marcadores de melanoma en éste tipo de tumor, lo que le otorgan al antígeno MC1R un potencial inmunoterapéutico.

Una importante aplicación derivada del hecho que se haya detectado MC1R en casi la mayoría de los melanomas uveales analizados, recae en el diagnóstico de estas lesiones ya que en la actualidad la confirmación histológica en el diagnóstico del melanoma ocular resulta en ocasiones errónea. Lo anterior, ocurre principalmente debido a la poca caracterización de esta neoplasia, y por ende, a la falta de antígenos específicos para el melanoma uveal. Debido a esta carencia de marcadores, hoy en día se utilizan los mismos anticuerpos tanto para el inmunodiagnóstico del melanoma cutáneo como el uveal. Estos dos tipos de tumores, aunque presentan características comunes, difieren por ejemplo en la expresión de moléculas asociadas a tumor, que en melanoma cutáneo es muy homogénea, a diferencia del melanoma ocular, que presenta diferentes patrones de expresión de estas moléculas. A causa de los problemas que esto acarrea, resulta de suma importancia el descubrimiento de nuevos marcadores específicos para melanoma ocular, que permitan un diagnóstico más certero de estas lesiones.

Con el objeto de extender nuestros estudios a líneas celulares derivadas de melanomas frescos, se intentó establecer líneas celulares a partir de biopsias provenientes de enucleaciones. Las células fueron mantenidas en cultivo por varios días, sin embargo, no se logró hacer proliferar estas células, pese a que las mismas se mantenían vivas. Por esta razón, estas células fueron criopreservadas y posteriormente caracterizadas. La

dificultad para establecer este tipo de células a partir de tumores se debe, principalmente, a que se trabajó con tumores oculares primarios, lo que dificulta el establecimiento de líneas celulares, debido posiblemente a la carencia de nuevas moléculas de adhesión, factores solubles secretados, etc. normalmente encontrados en tumores metastásicos.

Hemos reportado que las células de melanoma ocular expresan MC1R a nivel extracelular, aunque la mayor expresión se encuentra a nivel citoplasmático, lo que podría representar un problema en una posible terapia basada en anticuerpos. Considerando que algunos autores han reportado que algunas citoquinas proinflamatorias pueden inducir la expresión de MC1R en la membrana plasmática de monocitos y macrófagos, en esta tesis se demostró que la incubación de células de melanoma ocular con ciertas citoquinas produce un efecto similar. Se observó que dentro de las poblaciones de melanoma ocular, se pudieron distinguir claramente dos poblaciones con diferentes niveles de expresión extracelular de MC1R, una con baja y la otra con alta expresión de este receptor. Al incubar con citoquinas, se logró inducir un aumento en la expresión de MC1R a nivel extracelular. Por análisis de citometría de flujo, encontramos que la población con bajos niveles extracelulares de MC1R desaparece, observándose una sola población con altos niveles de MC1R en la membrana de estas células.

Por otra parte, la expresión total de MC1R, no varió significativamente después de la incubación con citoquinas, lo que indica que existiría una movilización de MC1R acumulado en el citoplasma hacia la membrana celular de las células y no una síntesis de nuevos receptores durante este periodo de tiempo.

En cuanto a la sensibilidad de las líneas celulares de melanoma ocular a la lisis mediada por anticuerpos utilizando células NK, no fue posible obtener una diferencia de lisis específica significativa utilizando el anticuerpo monoclonal anti-MC1R, a diferencia de la lisis observada para las células controles utilizadas (K562). Al incubar con estas líneas celulares con IFN- γ , no se observó un aumento en la lisis específica, debido quizás a que los receptores anti-Fc presentes en las células NK, no fueron capaces de reconocer los fragmentos Fc del anticuerpo utilizado. Lo anterior pudo deberse a que el AcMo anti-MC1R fue generado en ratón, por lo que éste probablemente no pudo ser reconocido por las células NK. Una de las proyecciones que se generarían en esta tesis sería realizar modificaciones en el anticuerpo (humanización) lo que permitiría aumentar la lisis por NK de células opsonizadas con nuestro anticuerpo anti-MC1R, lo que le otorgaría una relevancia clínica a los anticuerpos anti- MC1R.

6. CONCLUSIONES

- Utilizando un anticuerpo monoclonal, se demostró que MC1R es sobreexpresado en la mayoría de las líneas células y tejidos de melanoma ocular analizados.
- El anticuerpo α -MC1R tiene alta sensibilidad y especificidad por el melanoma ocular de tipo epitelial y mixto.
- La expresión de superficie de MC1R puede ser inducida por citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α .
- MC1R debe ser utilizado como marcador suplementario en el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas.
- MC1R puede ser utilizado como blanco en posible inmunoterapia contra el cáncer.

BILIOGRAFIA

Abdel-Malek Z., Scott MC., Suzuki I., Tada A., Im S., Lamoreux L., Ito S., Barsh G. and Hearing VJ. (2000). The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res* 13 (suppl 8):156.

Banchereau J. and Palucka AK. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5:296.

Bhardwaj RS., Becher E., Mahnke K., Hartmeyer M., Schwarz T., Scholzen T. and Luger TA. (1997). Evidence for the differential expression of the functional α -melanocyte stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J Immunol* 158:3378.

Bhardwaj RS. and Luger TA. (1994). Proopiomelanocortin production by epidermal cells: Evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. *Arch Dermatol Res.* 262:452.

Bohm M., Schulte U., Kalden H. and Luger TA. (1999). Alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates activation of NF- κ B and AP-1 and secretion of interleukin-8 in human dermal fibroblasts. *Ann NY Acad Sci* 885:227.

Bumol T.F. and Reisfeld R.A. (1981). Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc. Natl. Sci. USA.* 79:1245.

Catania A., Rajora N., Capsoni F., Minonzio F., Star RA., and Lipton JM. (1996). The neuropeptide α -MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis *in vitro*. *Peptides* 17:675.

Chakraborty AK., Orlow SJ., Bologna JL. and Pawelek JM. (1991). Structural/functional relationship between internal and external MSH receptors: Modulation of expression in Cloudman melanoma cells by UVB radiation. *J. Cell. Physiol.* 147:1.

Chhajlani V. and Wikberg JE. (1992). Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309:417.

Cochran AJ., Holland GN., Wen DR., Herscman HR., Lee WR., Foos RY. and Straatsma BR. (1983). Detection of cytoplasmatic S-100 protein in primary and metastatic intraocular melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24:1153.

Cone RD. (2000). *The Melanocortins Receptors*, Humana Press, Totowa, NJ.

Coulie PG., Brichard V., Van Peal A., Wolfel T., Schneider J., Traversari C., Mattei S., De Plaen E., Lurquin C., Szikora JP., Renault JP. and Boon T. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 180:35.

Damato B. (2004). Developments in the management of uveal melanoma. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 32:639.

Dudley ME. and Rosenberg SA. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 3:666.

Eberle A. (1988). *The Melanotropins.* Karger, Basel, Switzerland.

Escobar A., López M., Serrano A., Ramírez M., Perez C., Aguirre A., Gonzalez R., Alfaro J., Larrondo M., Fodor M., Ferrada C. and Salazar-Onfray F. (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clinical and Experimental Immunology.* 142:555.

Gantz I., Yamada T., Tashiro T., Konda Y., Shimoto Y., Miwa H. and Trent JM. (1994). Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 19:394.

Hunt G., Donatien PD., Lunec J., Todd C., Kyne S. and Thody AJ. (1994). Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res.* 7:217

Kapur RP., Bigler SA., Skelly M. and Gown AM. (1992). Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 40:207.

Kawakami Y., Eliyahu S., Sakaguchi K., Robbins PF., Rivoltini L., Yanneli J., Apella E. and Rosemberg SA. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the Mart-

1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180:347.

Lotze MT., Chang AE., Seipp CA., Simpson C., Vetto JT. and Rosenberg SA. (1986). High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. Responses, treatment-related morbidity, and histologic findings. *JAMA* 256:3117.

Rana BK. (2003). New insights into G-protein-coupled receptor signalling from the melanocortin receptor system. *Mol Pharmacol.* 64:1.

Salazar-Onfray F., López M., Lundqvist A., Aguirre A., Escobar A., Serrano A., Korenblit C., Petersson M., Chhajlani V., Larsson O. and Kiessling R. (2002). Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 Receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 87:414.

Salazar-Onfray F., Nakazawa T., Chhajlani V., Petersson M., Kärre K., Massuci G., Celis E., Sette A., Southwood S., Appella E. and Kiesling R. (1997). Synthetic peptides derived from the melanocyte-stimulating hormone receptor MC1R can stimulate HLA-A2 restricted LTC that recognize naturally processed peptides on human melanoma cells. *Cancer res.* 57:4348.

Schauer E., Trautinger F., Köck A., Bhardway S., Simon M., Shwartz T. and Luger TA. (1994). Proopiomelanocortin derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 93:2258.

Scholzen T., Armstrong CA., Bunnett N., Luger TA., Olerud J., Ansel JC. (1998). Neuropeptides in the skin: Interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol.*7:81.

Slominski A., Wortsman J., Luger T., Paus R. and Solomon S. (2000). Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol. Rev.* 80:979.

Star RA., Rajora N., Huang J., Stock RC., Catania A. and Lipton JM. (1995). Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by α -melanocortinstimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8016.

Stern M. and Herrmann R. (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 54:11.

Suzuki Y., Cone RD., Im S., Nordlund J. and Abdel-Malek ZA. (1996). Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology.* 137:1627.

Taherzadeh S., Sharma S., Chhajlani V., Gantz I., Rajora N., Demitri MT., Kelly L., Zhao H., Ichiyama T., Catania A. and Lipton JM. (1999). A-MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor- α production by human monocyte/macrophages. *Am J. Physiol.* 276:R1289.

Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A., Aguirre A., Escobar A., Serrano A., Korenblit C., Petersson M., Chhajlani V., Larsson O. and Kiessling R. (2002). Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer*. 87:414.

Townsend AR., Gotch FM. and Davey J. (1985). Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell*. 42:457.

Thornwall M., Dimitriou A., Xu X., Larsson E. and Chhajlani V. (1997). Immunohistochemical detection of the Melanocortin 1 Receptor in human testis, ovary and placenta using specific monoclonal antibody. *Horm. Res*. 48:215.

Wikberg JE., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C. and Sottner A. (2000). New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res* 42:393.

Xia Y., Muceniece R. and Wikberg JES. (1996). Immunological localization of Melanocortin 1 Receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Letters*. 98:157.

Zinkernagel RM. and Doherty PC. (1974). Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semiallogenic system. *Nature*. 248:701.