



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**PARTICIPACIÓN DE LAS CELULAS DE
LANGERHANS EN LA RESPUESTA INMUNE
CONTRA MELANOMA MURINO INDUCIDO
EXPERIMENTALMENTE.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA EL:

BIOL. MIGUEL ANGEL HERRERA ENRIQUEZ

**TUTOR: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
TUTOR: M. EN C. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ
ASESOR: DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO
ASESOR: DR. ENRIQUE AGUSTÍN SAMPEDRO CARRILLO**

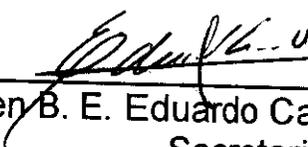
MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2004

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA, APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DIA 13 DE OCTUBRE DE 2004.



Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
Presidente



M. en B. E. Eduardo Casas Hernández
Secretario



Dr. Fernando García Tamayo
Vocal



Dr. Enrique Agustín Sampedro Carrillo
Vocal

TUTOR

Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez
Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
castell@servidor.unam.mx

TUTOR

M. en C. Eduardo Casas Hernández
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
dino@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Fernando García Tamayo
Departamento de Inmunología, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
tamayo@servidor.unam.mx

ASESOR

Dr. Enrique Agustín Sampedro Carrillo
Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional
“Lic. Adolfo López Mateos” del ISSSTE
esampiter@aol.com

LA MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, FORMÓ PARTE DEL PADRÓN DE PROGRAMAS DE POSTGRADO DE EXCELENCIA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON NÚMERO DE REGISTRO: 309-0; Y ACTUALMENTE SE ENCUENTRA DENTRO DEL PADRÓN DE PROGRAMAS DE PIFOP-CONACYT CLAVE C/PFPN-2002-35-32.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS A LA BECA-CRÉDITO OTORGADA POR EL CONACYT CON NÚMERO 169524.

“El juicio a Galileo comenzó el 12 de abril de 1633 en Roma. A principios de ese año, la Santa Inquisición le notifica su obligación a presentarse ante el Tribunal Eclesiástico por negar la “verdad infalible” de que la Tierra y no el Sol era el centro del Universo.

Ante la presión de sus juzgadores y la posible sentencia de ser quemado vivo en la hoguera abjura a sus ideas en junio del mismo año.

Según la tradición, después de su arrepentimiento Galileo murmura la frase “Eppur si muove” (“y sin embargo se mueve”) finalmente su sentencia se conmuta por arresto domiciliario a perpetuidad.

“En cuestiones de Ciencia, la autoridad de mil no vale lo que el humilde razonamiento de un solo individuo”

Galileo Galilei

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de éste trabajo.

En primer término al **Postgrado en Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

A los laboratorios en donde se realizó el presente trabajo:

- Laboratorio de Inmunoterapia del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Laboratorio de Fertilización de Mamíferos, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana.

A los integrantes de mi comité tutorial por su invaluable participación, comentarios y revisión continua del proyecto.

III.

IV. Dr. Andrés E. Castell Rodríguez
M. en C. Eduardo Casas Hernández
Dr. Fernando García Tamayo
Dr. Enrique A. Sampedro Carrillo

Al personal técnico que colaboró en el montaje, estandarización y desarrollo de las metodologías implementadas en el presente estudio.

Biol. Beatriz Hernández Téllez por su colaboración técnica durante el desarrollo del presente estudio.

M.C. Sara Judith Álvarez Pérez por su colaboración técnica durante el desarrollo del presente estudio.

T.H. Verónica Rodríguez Mata por su colaboración técnica durante el desarrollo del presente estudio.

Aux. de Lab. Herminia Suárez por su colaboración durante el desarrollo del presente estudio.

El presente trabajo formó parte del proyecto número "135669-M" financiado por el **CONACYT**.

El presente trabajo formó parte del proyecto número IN212704 financiado por la **DGPA** de la **UNAM**.

A mis Padres, "Alvaro y Marcela" por su inmenso apoyo, no solo para que hoy haya podido terminar con bien ésta etapa de mi formación, sino por todo el amor y comprensión que a lo largo de mi vida me han dado y que gracias a esto hoy soy quien soy. "LOS AMO"

A mis Hermanos, "Alvaro, Javier, Hugo, Omar y Zu. Ah y por supuesto Pólux" por sus críticas, consejos, discusiones y bromas, porque en los momentos de cansancio y hartazgo siempre me hacen sonreír y cuando pierdo el rumbo siempre están para darme un jalón para y retomar el animo y continuar en éste camino. GRACIAS POR TODO

A mi Abuelo "Rodrigo", por tu ejemplo y por todos los momentos e ideas que me haz transmitido y que cada vez extraño mas.

A Betty, por todo tu amor, apoyo, ayuda y empujones para que hoy presente esta tesis. GRACIAS

A mi amigo y maestro Andrés por seguirme ayudando a crecer y porque todavía puedo aprenderte algo, GRACIAS.

A mis inseparables amigos que conocí en la Facultad de Ciencias y que ahora son una parte muy importante de mi persona. Por todo lo que significa contar con su amistad y que sea cuál sea la situación siempre están allí, GRACIAS.

A la familia García de Icaza por todo su cariño y amistad incondicional GRACIAS.

A mis amigos y compañeros del laboratorio en la Facultad de Medicina, por todo lo que vivimos día a día y porque esta tesis también es parte suya.

A mis amigos y compañeros de la Universidad Anáhuac, por todos los momentos que hemos vivido juntos y por los que vienen.

A mis colegas de la generación 2002 de la M. en B. E. Por su amistad y todas las discusiones que sostuvimos en los salones de clase y por todas las ideas y sugerencias que aportaron a este trabajo.

A Toda mi familia, porque gracias a la familia los individuos se pueden convertir en personas.

A todos los que no mencione, pero que me acuerdo de ellos. GRACIAS

**Para TI por haber entrado a mi vida así,
sin avisar, sin saber como, sin mirar
solamente sabiendo que ahí quieres estar
y porque ahora eres la otra parte de mi.**

TE AMO

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA, APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DIA 13 DE OCTUBRE DE 2004.

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
Presidente

M. en B. E. Eduardo Casas Hernández
Secretario

Dr. Fernando García Tamayo
Vocal

Dr. Enrique Agustín Sampedro Carrillo
Vocal

ÍNDICE

INDICE	1
MELANOMA	2
Diagnóstico de Melanoma.....	3
Tasa de supervivencia.....	6
Clasificación del Melanoma	7
TERAPIAS EXISTENTES CONTRA EL MELANOMA.....	8
Tipos de cirugía contra el melanoma.....	8
Tipos de Quimioterapia contra el melanoma	9
Tipos de Radioterapia contra el melanoma	11
Tipos de Inmunoterapia contra melanoma	11
INMUNOTERAPIA	14
Historia de la inmunoterapia	14
Evasión tumoral a las respuestas inmunológicas.....	16
Citocinas involucradas en la Inmunidad antitumoral.....	16
CÉLULAS DE LANGERHANS Y EL SISTEMA DE CELULAS DENDRÍTICAS	19
CÉLULAS DENDRÍTICAS	19
HISTORIA DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	20
FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS.....	21
ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	22
SISTEMA DE CELULAS DENDRITICAS	23
CÉLULAS DENDRÍTICAS y CÁNCER	27
OBJETIVOS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	33
HIPÓTESIS	33
DISEÑO EXPERIMENTAL	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
Caracterización y expansión de la línea celular B16.....	37
Aislamiento de CL	38
Purificación de antígenos MAGE	43
Estimulación de Respuestas Lincfocitarias	45
CONCLUSION	49
REFERENCIAS	52

MELANOMA

En la actualidad los distintos tipos de cáncer constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. La mortalidad por cáncer sólo es rebasada por las afecciones cardiovasculares. De acuerdo con datos publicados por la OMS, se registran entre 2 y 3 millones de nuevos casos de cáncer de piel cada año en el mundo, y de estos, alrededor de 130 mil corresponden a melanoma maligno. De acuerdo con la misma organización esta tendencia va en aumento debido a 2 razones principales, el cambio de costumbres de la población mundial, donde cada vez es más frecuente la sobre-exposición a los rayos solares principalmente durante la infancia, así como el deterioro de la capa de ozono y por lo tanto la pérdida de su importante papel filtrador de rayos UV. De hecho se sabe desde hace tiempo que el sistema inmunológico es vulnerable a la radiación UV que disminuye su efectividad por modificaciones en la actividad y distribución de las células encargadas de conducir las respuestas inmunológicas¹.

El melanoma maligno aunque tiene mucho menor prevalencia que otros cánceres de piel posee dos características que los hacen de importancia clínica: es el más letal y, su incidencia ha incrementado significativamente en 4% anual desde 1970.

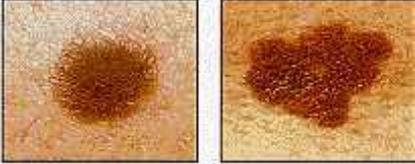
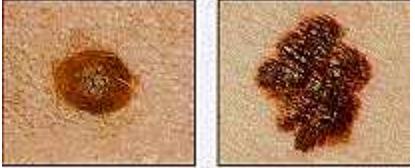
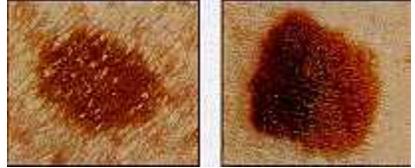
Una situación particularmente grave del melanoma maligno, es que se le da poca atención a las lesiones premalignas, por lo que cuando se realiza el diagnóstico, el tumor ya ha rebasado la membrana basal de la epidermis. Debido a la gran capacidad de invasión y de metástasis, aproximadamente el 50% de los pacientes muere dentro de los primeros 5 años².

Se han descrito varios factores de riesgo para desarrollar melanoma maligno:

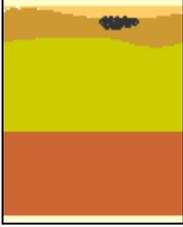
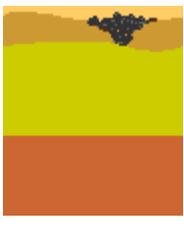
- a) Nevos nevocíticos abundantes. Es el principal factor de riesgo en poblaciones caucásicas.
- b) Exposiciones intensas, continuas o intermitentes a radiación UV solar, en particular en sujetos de piel blanca.

DIAGNÓSTICO DE MELANOMA

El diagnóstico clínico de melanoma maligno se facilita cuando se emplea el sistema ABCD, para la evaluación de lesiones pigmentadas de la piel.

<p>A (Asimetría)</p> <p>Los melanomas tempranos frecuentemente son asimétricos, si trazamos una línea a la mitad de la lesión generalmente no podemos obtener mitades iguales</p>	
<p>B (Bordes)</p> <p>Los bordes de los melanomas tempranos no son fáciles de distinguir o no están bien delimitados.</p>	
<p>C (Color)</p> <p>Los melanomas tempranos frecuentemente experimentan cambio de color en algunas áreas con sombras cafés y negras aunque pueden ser de otros colores.</p>	
<p>D (Diámetro)</p> <p>Los melanomas tempranos frecuentemente son de mayor tamaño que los lunares (diámetros mayores a 0.75 cm aunque pueden ser menores)</p>	

Los melanomas malignos muestran dos patrones básicos de crecimiento. En primer lugar tenemos el crecimiento radial, que originalmente no es invasivo y en caso de evolucionar pasa a serlo, y en segundo lugar, el crecimiento vertical que como regla es invasivo.

Epidermis			
Dermis			
Hipodermis			
	Crecimiento radial (fase no invasiva)	Crecimiento radial (fase invasiva)	Crecimiento vertical (fase invasiva)

Los melanomas incipientes cuando están en fase de crecimiento radial, sea este invasivo o no invasivo, pueden curarse por completo por escisión quirúrgica. Si el tumor llega a la dermis (atravesando la membrana basal epidérmica) por medio del crecimiento vertical, las posibilidades de curación se reducen considerablemente, debido a que las células tumorales ahora se encuentran en contacto con vasos sanguíneos y linfáticos, lo que favorece el desarrollo de metástasis³.

El diagnóstico específico del melanoma maligno requiere la evaluación histológica de una biopsia. El anatomopatólogo debe comprobar el diagnóstico de melanoma maligno sobre la base del aspecto característico de las células tumorales. Además debe reportar el estado de los bordes de resección quirúrgica, así como valorar el grado de penetración del tumor. El sistema más comúnmente empleado para este fin es el de Clark. En este, se emplea una escala de cinco niveles referidos con números romanos como sigue:

Niveles de Clark para valoración de melanoma maligno

- I. Tumor localizado a la epidermis
- II. Tumor en dermis superficial (papilar)
- III. Tumor invade completamente la dermis papilar sin llegar a la reticular
- IV. Tumor que invade toda la dermis reticular
- V. Tumor que rebasa la dermis reticular

La supervivencia a cinco años de los pacientes con melanoma maligno, disminuye significativamente en la medida en que el nivel de Clark es mayor.

Otro sistema empleado para valorar los melanomas malignos se conoce como medición del índice de Breslow⁴. En estos casos, se adapta al microscopio un sistema micrométrico diseñado para medir con precisión en espesor del tumor. Las lesiones con espesor menor a 1 mm, tienen el mejor pronóstico con muy pocas posibilidades de diseminación metastásica. Los tumores con espesor mayor a 1 mm implican un pronóstico más sombrío⁵. Si bien existen muchos trabajos que correlacionan el índice de Breslow con el pronóstico del paciente en estudio, en la práctica es más común emplear el sistema de Clark que no requiere del micrómetro.

Una vez que se cuenta con la información anatomopatológica completa, el médico tratante puede aplicar el sistema TNM para situar al paciente en un grupo pronóstico específico, que se conoce como "etapa".

Aplicado específicamente al caso del melanoma maligno, el sistema TNM se maneja como sigue:

La letra T que significa tumor. Valora el grosor del tumor y si está o no ulcerado

La letra N valora si el melanoma se ha propagado a los ganglios linfáticos (lymphoid node)

La letra M indica si hay metástasis a órganos distantes.

La etapa se describe usando 0 y números romanos del I al V. Las mejores tasas de sobrevivida a cinco años se observan con números menores.

Los posibles valores de la T son:

TX: No se puede evaluar el tumor primario

T0: No existe evidencia de tumor primario

Tis: Melanoma in situ (no ha invadido)

T1: El melanoma es menor que o igual a 1.0 mm de grosor sin ulceración y nivel Clark II o III (vea Ta y Tb)

T2: El grosor del melanoma mide de 1.01 a 2.0 mm con o sin ulceración

T3: El grosor del melanoma mide de 2.01 a 4.0 mm con o sin ulceración

T4: El grosor del melanoma mide más de 4.0 mm con o sin ulceración

Cualquier Ta = no ulcerado

Cualquier Tb = ulcerado

Los posibles valores de la N dependen de si se realizó una biopsia de ganglio linfático.

NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales

N0: No existe metástasis en los ganglios linfáticos regionales

N1: Metástasis en un ganglio linfático

N2: Metástasis en 2 ó 3 ganglios linfáticos o propagación del melanoma a la piel que va hacia un área cercana al ganglio linfático

N3: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos o propagación a la piel que va hacia un área cercana al ganglio linfático y al ganglio(s) linfático(s).

Cualquier Na significa que el melanoma se observa solamente bajo el microscopio.

Cualquier Nb significa que el melanoma en el ganglio linfático es visible a simple vista.

Los valores de la letra M son:

MX: La presencia de metástasis a distancia no puede ser evaluada

M0: No hay metástasis

M1a: Metástasis a la piel o tejidos subcutáneos (debajo de la piel) o a ganglios linfáticos distantes

M1b: Metástasis al pulmón

M1c: Metástasis a otros órganos

En el sistema TNM, el médico usa cada letra (T,N,y M) y un número correspondiente. Por ejemplo, un melanoma puede ser clasificado como T2, N0, M0.

TASA DE SUPERVIVENCIA

Para que esta información se más comprensible, algunas de las descripciones TNM pueden ser agrupadas en un grupo simple de etapas (estadios) del 0 al IV.⁵

Etapa 0: Tis, N0, M0. Sobrevida a los 5 años de 97%.

Etapa I: T1, N0, M0 y T2, N0, M0. Sobrevida a los cinco años de 90 a 95%.

Etapa II: T3, N0, M0 y T4, N0, M0. Sobrevida a los 5 años de 85%.

Etapa III: Cualquier valor de T, N1 o N2 y M0. Sobrevida a los 5 años de 45%.

Etapa IV: Cualquier valor de T y cualquier valor de N con M1. Sobrevida a los 5 años de 10%.

Otros factores de riesgo para la supervivencia: La edad es otro factor que afecta la supervivencia. En cada etapa, las personas de mayor edad tienen una supervivencia menor. La supervivencia disminuye aún más a partir de los 70 años. Las personas infectadas con HIV también tienen un riesgo mayor de morir si contraen melanoma.⁵

CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA DEL MELANOMA

De acuerdo a su tamaño y localización los melanomas se pueden clasificar en 4 grandes grupos^{6,7,8}

Melanoma de extensión superficial. Es el tipo más común siendo alrededor del 70% de los casos, se caracteriza por ser aplanado carente de crecimiento vertical, puede permanecer mucho tiempo en esta fase. Se presenta como una placa descolorida con bordes irregulares y variaciones de color pueden ser localizadas en cualquier parte del cuerpo, pero son más frecuentes en el tronco en varones, en las piernas en mujeres, y en la espalda en ambos sexos.

Melanoma lentigo maligno. Es similar al de extensión superficial, aunque se puede formar una pequeña elevación de la lesión, también puede permanecer largos periodos sin crecimiento vertical, este tipo de melanoma in situ es más frecuente en la vejez en zonas expuestas crónicamente el sol.

Melanoma acral lentiginoso. Aunque también se extiende superficialmente, este tipo tumoral difiere de los dos primeros ya que usualmente aparece como manchas cafés o negras debajo de las uñas, en la planta de los pies y en las palmas; con frecuencia aparece en personas de piel oscura.

Melanoma nodular. Este tipo es invasivo y se reconoce por la formación de nódulos sobresalientes, por su color negro y por localización en tronco, piernas, brazos y cabeza. Este tipo tumoral ocupa del 10 al 15 % de los casos.

TERAPIAS EXISTENTES CONTRA EL MELANOMA

Tipos de cirugía contra el melanoma^{5,10}

Escisión simple: Los melanomas de poca profundidad pueden curarse por completo mediante una cirugía relativamente menor llamada escisión simple. El tumor es extirpado junto con una pequeña porción de piel normal en los bordes. Se llaman márgenes a la piel sana y normal que está limitando al tumor. Los márgenes deben ser cuando menos 2.0 cm.

Reescisión (escisión amplia): Cuando un diagnóstico de melanoma es establecido por la biopsia, será necesario volver a hacer una escisión en el área. Se eliminará más piel del área del melanoma, y el tejido extraído se examinará para asegurarse de que no queden células cancerosas en la piel.

Grosor del tumor	Márgenes recomendados
In situ	0.5 cm
Menos de 1 mm	1 cm
1 a 2 mm	1 a 2 cm
2 a 4 mm	2 cm
Más de 4 mm	Por lo menos 2 cm

Amputación: Si el melanoma está en un dedo del pie o de la mano, el tratamiento pudiera requerir la amputación de ese dedo. Con anterioridad, se trataban algunos melanomas de los brazos y las piernas mediante amputación, pero en la actualidad este procedimiento ya no se utiliza ya que existen estudios que han demostrado que la escisión amplia de los melanomas del brazo y de la pierna es tan eficaz como la amputación.

Resección de los ganglios linfáticos: Una vez hecho el diagnóstico del melanoma, el médico examinará los ganglios linfáticos más cercanos al melanoma. Si los ganglios linfáticos no están aumentados de tamaño se puede hacer una biopsia del ganglio linfático centinela¹¹. Si el ganglio linfático centinela no tiene tumor, es muy poco probable que los demás ganglios tengan metástasis, por lo que se evita su resección. Por otro lado, si el ganglio linfático centinela es positivo para metástasis, se recomienda la linfadenectomía radical.

Como puede apreciarse en el sistema de etapificación basado en TNM, la presencia de metástasis ganglionares traduce un pronóstico más sombrío que el observado en los pacientes sin ganglios afectados por el tumor.

Cirugía del melanoma metastático En general los pacientes con metástasis extraganglionares se consideran inoperables. Las indicaciones de cirugía en estos pacientes incluyen casos en los que el implante metastático permite un abordaje sencillo y completo, o en los casos en que la extirpación quirúrgica represente ventajas en la calidad del paciente, como puede ser el caso de los que tienen metástasis cerebrales.

Tipos de Quimioterapia contra el melanoma^{5,12,13}

La quimioterapia es un tratamiento con medicamentos que destruyen las células cancerosas. La quimioterapia sistémica utiliza medicamentos contra el cáncer que se inyectan generalmente en una vena o se administran por vía oral. Estos medicamentos viajan a través del torrente sanguíneo y atacan a las células cancerosas que ya se han propagado más allá de la piel para afectar los ganglios linfáticos y otros órganos.

Los medicamentos utilizados en la quimioterapia destruyen las células cancerosas, pero también afectan células normales, en particular aquellas que se encuentran en tejidos con recambio importante como es el caso de la médula ósea, los epitelios mucosos del tracto digestivo y los queratinocitos epidérmicos y los asociados con los folículos pilosos. Por lo anterior debe prestarse atención a los efectos secundarios, que dependen del tipo de medicamento, de la cantidad

administrada y de la duración del tratamiento. Entre los efectos secundarios temporales de la quimioterapia sistémica pueden encontrarse las náuseas y vómitos, la pérdida del apetito y la caída del cabello.

La lesión a las células de médula ósea traduce disminución en los recuentos celulares en sangre periférica, en particular de eritrocitos y leucocitos neutrófilos, lo que traduce:

- § Mayores probabilidades de infección
- § Sangrado o hematomas después de cortaduras o lesiones menores
- § Cansancio

Para el melanoma en la etapa IV se pueden utilizar varios tipos de quimioterapias sistémicas. Aunque por lo general, la quimioterapia no es tan eficaz en el melanoma como en otros tipos de cáncer, puede aliviar los síntomas o prolongar la vida de algunos pacientes con melanoma en etapa IV.

Los quimioterápicos que se utilizan con más frecuencia para tratar al melanoma incluyen:

- § Dacarbazina (llamada también DTIC), sola o en combinación con otros quimioterápicos como la carmustina (conocida también como BCNU) y el cisplatino. La combinación de estos 3 quimioterápicos, junto con el tamoxifeno (un medicamento de terapia hormonal utilizado con más frecuencia para tratar el cáncer de la mama) es llamada "régimen de Dartmouth".
- § El cisplatino, la vinblastina y la DTIC es otra combinación de quimioterapia para tratar el melanoma.
- § La temozolomida es un nuevo medicamento que presenta la misma efectividad que la DTIC en cuanto a destrucción de células tumorales pero con la ventaja que se puede administrar en forma de pastilla.

Los estudios recientes indican que la combinación de varios quimioterápicos con uno o más medicamentos de inmunoterapia pudiera ser más eficaz que un solo medicamento de quimioterapia. Las combinaciones de quimioterapia combinadas con medicamentos de inmunoterapia incluyen el alfa-interferón o la

interleucina-2 Este tipo de tratamiento también se conoce como bioquimioterapia.

La perfusión de extremidades aisladas es un tipo de quimioterapia experimental utilizado algunas veces para tratar los melanomas metastásicos limitados a los brazos y las piernas. Este método separa temporalmente la circulación de la extremidad en cuestión del resto del cuerpo e inyecta altas dosis de quimioterápicos en la arteria que alimenta la extremidad. Esto permite que se administren altas dosis al área del tumor sin exponer a los órganos internos a estas dosis que, de lo contrario, podrían causar graves efectos secundarios. El melfalán es el medicamento usado más comúnmente para este procedimiento de quimioterapia.

Tipos de Radioterapia contra el melanoma

La radioterapia utiliza rayos de alta energía o partículas para destruir las células cancerosas. La radioterapia externa enfoca la radiación desde fuera del cuerpo sobre el tumor de la piel.

La radioterapia no se usa generalmente para tratar el melanoma primario localizado en piel. Sin embargo, se puede usar para tratar el melanoma recurrente, ya sea en la piel o en los ganglios linfáticos, si no se puede extraer completamente mediante cirugía. También se puede utilizar para evitar la metástasis.

Quizás la función principal de la radioterapia sea el alivio de los síntomas de las metástasis al cerebro o a los huesos. Por ejemplo, una metástasis de melanoma al cerebro pudiera causar parálisis, mareos intensos u otros síntomas que se pueden aliviar temporalmente mediante radioterapia.

Tipos de Inmunoterapia contra melanoma^{5,14,15,16}

La inmunoterapia mejora y estimula el sistema inmunológico de un paciente para que reconozca y destruya las células cancerosas con más eficacia. Hay varios tipos de inmunoterapia que se utilizan en el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado.

Terapia con citocinas. Dos citocinas, el alfa-interferón y la interleucina-2, pueden ayudar a estimular la inmunidad en los pacientes con melanoma. Ambos medicamentos pueden ayudar a reducir el tamaño de los melanomas metastásicos (etapas III y IV) entre el 10% y el 20% de los pacientes.

Los efectos secundarios de las citocinas pueden incluir fiebre, escalofríos, dolores y cansancio intenso. La interleucina-2, especialmente en altas dosis, puede causar secuestro de líquidos al tercer espacio lo que se asocia con intenso malestar general. En algunos casos es necesario hospitalizar a estos pacientes.

Interferón alfa 2b: Los pacientes que tienen melanomas profundos a menudo tienen células cancerosas que se desprenden del melanoma primario y viajan a otras partes del cuerpo, y es en estas circunstancias que el interferón-alfa2b se puede utilizar como terapia adyuvante.

En diversos estudios se ha demostrado que se tienen que administrar altas dosis de interferón para que la terapia sea eficaz. Sin embargo, muchos pacientes no pueden tolerar los efectos secundarios que ocasionan las altas dosis de interferón. Los efectos secundarios del interferón alfa2b incluyen fiebre, escalofríos, dolores y cansancio intenso. También puede afectar al corazón y el hígado, por lo que los pacientes deben recibir seguimiento por parte de un oncólogo con experiencia en este tratamiento.

El interferón alfa2b que se les administra a los pacientes de melanoma en etapa III después de la cirugía puede retrasar la recurrencia del melanoma. Al tomar la decisión de usar la terapia adyuvante, los pacientes y sus médicos deben considerar los posibles beneficios y efectos secundarios de este tratamiento. El interferón pudiese también administrarse como parte de un régimen de bioquimioterapia para los pacientes en etapa IV de melanoma.

Terapia de vacunas: Las vacunas contra el melanoma son terapias experimentales que aún no han probado sus beneficios.

El principio de las vacunas contra el melanoma es similar al de las empleadas para las enfermedades virales, en las que se emplean virus debilitados o partes del virus que no son patogénicas, de modo que el sistema inmune se estimule para la destrucción viral. De manera semejante, los antígenos del melanoma

pueden inyectarse en pacientes con la intención de estimular al sistema inmune. En general, las células de melanoma o los antígenos aislados se encuentran mezclados con sustancias estimulantes del sistema inmune. Desafortunadamente la manufactura de una vacuna antitumoral representa muchos más problemas que la de una para combatir virus. En algunos casos el problema reside en la limitación para elaborar cantidades suficientes como para probarse en poblaciones amplias de pacientes.

Actualmente hay estudios clínicos que se están realizando en la actualidad para probar el valor del tratamiento con vacunas en pacientes de melanoma en etapas III o IV, a veces combinadas también con la terapia de citocinas. Estos estudios han estado progresando lentamente y sus resultados han sido ambiguos.

Inmunoterapia con BCG.

Actualmente se ha aislado a partir del bacilo Bacillus Calmette Guerin (BCG) y de Mycobacterium tuberculosis una proteína resistente al choque de calor (hsp) de 65 kDa que se encuentra conservado en un gran número de micobacterias, que estimula los efectos antitumorales de la terapia de BCG, la cuál ha tenido una efectividad bastante aceptable y ha sido ampliamente utilizada, recientemente se ha demostrado en cultivo que a células de melanoma de la línea B-16 a las que se les ha transfectado el gen de éste antígeno de 65kDa y posteriormente se les aplica una inmunoterapia de BCG se aumenta el efecto antitumoral¹⁷.

INMUNOTERAPIA

HISTORIA DE LA INMUNOTERAPIA

Una de las cuestiones más controversiales en el ámbito de la inmunología y la oncología por más de un siglo ha sido “¿Puede el sistema inmune reconocer y eliminar tumores malignos?” múltiples respuestas se han dado a esta cuestión algunas a favor, otras en contra, dependiendo de las teorías inmunológicas dominantes en el momento.

Parish,¹⁸ en su excelente artículo de revisión, menciona que la primera implicación terapéutica que se le dio al sistema inmune con respecto a distintos tumores malignos fue en el siglo XIX, por William Coley, quien observó que en pacientes cancerosos que presentaban un cuadro de infecciones febriles, en algunos de ellos se presentaba una reducción aparentemente espontánea del tumor.



En 1893 Coley¹⁹ notó que al inyectar una suspensión de un cultivo de estreptococos a pacientes con cáncer en algunos de los casos los tumores sufrían regresión, explicando que esta infección estimulaba al sistema inmunológico resultando en la eliminación del tumor. Al preparado bacteriano que usó se le conoció como “toxina de Coley”. Años después, Ehrlich²⁰ (1909) propuso que de no ser por el sistema inmunológico el número de nuevos casos de cáncer y su tasa de crecimiento sería muy superior a la observada. Sin embargo, el estudio de la participación del sistema inmunológico contra distintos tumores fue abandonado por varias décadas, y no fue sino hasta los años 30 en que se retomó la idea de regular la aparición y crecimiento de tumores vía el sistema inmunológico.

Woglom,²¹ en 1929, mediante un estudio de homo y auto transplantes de tumores demostró el rechazo de transplante de tumores incluso en el caso de auto transplantes, por lo que planteó la existencia de antígenos asociados a los tumores (AAT) y que estos eran los responsables del rechazo. Sin embargo, en esos momentos estaba en apogeo la teoría de la delección de linfocitos auto inmunes durante la vida prenatal, establecida por Burnet, que negaba la

posibilidad de que el sistema inmunológico pudiera responder ante células malignas, ya que se asumía que las células transformadas eran indistinguibles de las normales, así mismo, se rechazaba la existencia de AAT simplemente alegando que el rechazo de los trasplantes era un artefacto de la técnica. Es de notar que el mismo Burnet, que durante los años cincuenta decía que era imposible la inmunoterapia contra el cáncer, en 1967²² publica su teoría de la Inmunovigilancia donde propone que los linfocitos se encuentran continuamente patrullando los tejidos en busca de células transformadas, eliminándolas presumiblemente vía reconocimiento de AAT.

Posteriormente en los años setenta los inmunólogos teóricos aducían que era poco probable que el sistema inmunológico hubiera evolucionado para reconocer y rechazar células malignas, argumentando que las infecciones agudas son mucho más agresivas, sobre todo para la población juvenil, lo que implica una mucho mayor presión evolutiva, al mismo tiempo que se publicaron evidencias en contra de la inmunovigilancia, como el hecho de que ratones atómicos tienen la misma proporción de tumores que los silvestres; y que la eficiencia de la deleción tímica de células auto inmunes es total. Posteriormente, en los años ochenta el punto de vista cambió nuevamente, ya que se demostró que la deleción tímica no era tan efectiva, ya que algunas clonas autoreactivas podían escapar de los procesos de maduración.

Más tarde, se logró la caracterización de una gran cantidad de AAT, y se reforzó la teoría de la inmunovigilancia con la caracterización de las células presentadoras de antígenos. Pero quizás uno de los mejores argumentos para apoyar a la inmunoterapia es que las células malignas poseen un genoma muy inestable, lo que permite la aparición de nuevos AAT específicos^{13,14}. Es de notar que en los años noventa y a principios del presente siglo se ha demostrado que las Células Dendríticas (CD) presentadoras de antígenos son capaces de presentar AAT e inducir respuestas inmunológicas. Por otro lado, también se ha demostrado que una gran variedad de ratones inmunodeficientes presentan una muy alta incidencia de tumores, lo que implica al sistema inmune innato como un importante mediador de la respuesta antitumoral.

Sin embargo, montar un sistema de inmunoterapia ideal resulta muy complicado ya que se requiere entre otras cosas: grandes cantidades de

linfocitos T citotóxicos (LTc) específicos para AAT, Células Presentadoras de Antígenos (CPA) con moléculas coestimuladoras como B7.1 y B7.2, el sistema inmune innato debe liberar señales de emergencia como las citocinas inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ y por tanto la regulación de una respuesta inmune Th1, así como el efecto mediado por los receptores CD40-CD154 presentes en linfocitos y CPA respectivamente, que condicionan una regulación positiva en la maduración de las CPA, en términos de expresión de moléculas MHC y B7.²³ Por otro lado, aunque la mayoría de los tumores no comparten AAT, se necesita inducir una proliferación de LTc en términos de MHC, además de disminuir los mecanismos de evasión inmunitaria por parte de las células tumorales.²⁴

En este sentido se puede decir que la inmunidad contra tumores depende de una activación inicial efectiva y la subsecuente proliferación de la respuesta de linfocitos CD8+ antígeno-específicos, así como del aumento de la concentración de citocinas en el microambiente. Lo anterior se ha logrado desarrollando la "terapia citosina-génica" que consiste en introducir genes de citocinas en células tumorales autólogas²⁵. También se han fabricado quimeras constituidas por la fusión de citocinas y anticuerpos específicos del tumor conocidas como inmunocitocinas, donde el anticuerpo se une a las células tumorales, mientras que la citosina estimula a las células inmunitarias directamente contra el tumor¹²

Específicamente en el caso del melanoma maligno, los sistemas de inmunoterapia se iniciaron empleando vacunas con lisados de células tumorales. Desafortunadamente los resultados no fueron significativos, por lo que se intentaron nuevos abordajes como el empleo de células dendríticas presentadoras de antígenos (CD) fusionadas con células de melanoma²⁶ o CD modificadas genéticamente para expresar antígenos tumorales como el MART-1^{27,28}.

EVASIÓN TUMORAL A LAS RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS

Los tumores malignos como el melanoma son capaces de desarrollar distintos mecanismos que modulan al sistema inmunológico para que no se desarrollen respuestas en su contra. En conjunto dichos fenómenos se conocen

como Mecanismos de Evasión Tumoral, los cuales pueden ir desde que las células tumorales pasen desapercibidas hasta la inducción de tolerancia. Algunos de los mecanismos de evasión tumoral pueden deberse a distintos procesos como la liberación de antígenos, enmascaramiento de antígenos, regulación de células efectoras o inhibidoras, o a la conjunción de varios de ellos.

En tumores inducidos experimentalmente se ha observado que las células malignas cuentan con una menor cantidad de MHC I en su superficie, lo que las hace poco susceptibles a linfocitos T citotóxicos (LTc), si a estas células se les induce la elevación de MHC I mediante tratamiento con IFN- γ entonces si pueden ser atacadas por LTc. Otro mecanismo utilizado por las células tumorales lo comparten con los virus, inactivando los genes de las proteínas transportadoras de antígenos²⁹

En una gran cantidad de tumores el sistema inmunológico adaptativo es capaz de disparar respuestas inmunológicas contra ellos, sin embargo, para ello se requiere que las células tumorales o que las CPA cuenten con una cantidad adecuada de MHC II y moléculas coestimuladoras como las B7, por lo que uno de los principales mecanismos de evasión es que las células transformadas carezcan de dichas proteínas de superficie o bien inducir que las CPA también carezcan de ellos³⁰.

Otros mecanismos tienen que ver con la pérdida o liberación de aquellos antígenos que puedan ser reconocidos por el sistema inmunológico, estos mecanismos son característicos de tumores con crecimiento rápido, y se debe tanto a la elevada tasa de mitosis como a la gran inestabilidad genética, lo que tiene como resultado una elevada incidencia de mutaciones y deleciones, por lo que los genes que codifican a los AAT, pueden perderse fácilmente, siempre y cuando no sean genes relacionados con el crecimiento o proliferación celular³¹.

Un mecanismo de evasión inmunológica más consiste en que las células tumorales suprimen la actividad del sistema inmunitario mediante la producción de citocinas, como por ejemplo el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β) que es secretado por muchos tumores e inhibe la proliferación linfocitaria, o la secreción del ligando de Fas (FasL) induciendo la apoptosis de los linfocitos³²

Otro mecanismo es que los antígenos de algunos tumores induzcan tolerancia al ser autoantígenos y que hayan sido detectados por el sistema inmune cuando estaba en desarrollo, o bien que los antígenos no sean inmunógenos sino tolerógenos y que sean reconocidos por linfocitos maduros ³³

CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA INMUNIDAD ANTITUMORAL

En algunas investigaciones se ha demostrado claramente la participación de algunas citocinas en la estimulación de respuestas inmunológicas contra distintos tumores. A un grupo de pacientes con melanoma en fase III y IV, se les sometió a inmunización con péptidos antigénicos derivados del tumor, como gp100, 2 veces a la semana durante 8 semanas, algunos de los pacientes recibieron el antígeno junto con IL-12 para evaluar la respuesta inmune en términos de producción de interferón gama, encontrando que en aquellos pacientes inmunizados con IL-12 la respuesta inmune fue superior y estuvo mediada por una gran respuesta celular CD8+, en comparación por la presentada en aquellos que no recibieron IL-12. Estos resultados sugieren que la IL-12 puede actuar como un señal distinta al TCR y a las moléculas coestimuladoras que revierte la tolerancia expandiendo las clonas de CD8+. ³⁴⁻³⁸

En algunas inmunoterapias, se han utilizado distintas citocinas para estimular las respuestas antitumorales contra melanoma, Rosenberg utilizó IL-2 para estimular respuestas inmunes e inducir reducción de los tumores de pacientes con melanoma, encontrando casos que iban desde una total remisión hasta una parcial reducción de las lesiones. ^{39,40} Por otra parte Fushimi⁴¹, demostró que la proteína inflamatoria 3 α de macrófagos (MIP3) estimula la migración de CD hacia los tumores y suprime el crecimiento tumoral.

CÉLULAS DE LANGERHANS Y EL SISTEMA DE CELULAS DENDRÍTICAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

El que un individuo sea capaz de montar una respuesta inmunitaria adecuada depende de la interacción concertada entre la inmunidad innata y la adaptativa. La inmunidad innata, antígeno no específica, se caracteriza por reconocer rápidamente a los patógenos, inducir daño tisular y contar con la capacidad de alertar a las células de la inmunidad adaptativa.

Este tipo de respuesta cuenta con la participación de células fagocíticas, linfocitos NK, el complemento y los interferones, que utilizan una serie de receptores que reconocen patrones moleculares compartidos por distintos patógenos, como por ejemplo el lipopolisacárido bacterial (LPS), carbohidratos, o ARN viral de doble hebra. Gracias a la presión evolutiva se desarrolló la inmunidad adaptativa, que cuenta con la capacidad del rearrreglo de los genes de las inmunoglobulinas, lo que permite la producción de una gran diversidad de clonas celulares antígeno específicas y por lo tanto posee la capacidad de desarrollar memoria inmunológica. Sin embargo este sistema necesita ser preinstruido y regulado fundamentalmente por células presentadoras de antígenos (CPA). A diferencia de los macrófagos las células dendríticas, que son células presentadoras de antígenos, son las únicas células capaces de inducir respuestas inmunológicas primarias, que inducen el establecimiento de memoria inmunológica.

Este grupo de células se encuentra distribuido en todo el organismo formando un sistema celular llamado "Sistema de Células Dendríticas" (SCD). Las células de este sistema, se caracterizan por presentar abundantes proyecciones citoplásmicas que justifican su nombre. Carecen de desmosomas y tonofilamentos; expresan el antígeno común leucocitario CD45, así como abundantes moléculas clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH). Sin embargo presentan otras características fenotípicas según el órgano en el que se encuentren, reflejando su actividad con respecto al microambiente en el que se localizan.^{42,43}

HISTORIA DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Este tipo celular fue observado por primera vez en 1868, por Paul Langerhans quien notó la presencia de una población celular dendrítica intraepidérmica localizada basal o suprabasalmente.⁴⁴

Langerhans y otros autores escribieron acerca de su función, clasificándolas como células del sistema nervioso^{45,46}. Sin embargo la "Teoría Neural" de las células de Langerhans se derrumbó con la llegada del microscopio electrónico, evidenciando que su ultraestructura era diferente a la de las células nerviosas y que además se podían encontrar en tejidos denervados⁴⁷, aunque quizá el principal hecho para objetar dicha teoría fue que nunca se observaron conexiones entre estas células y las terminaciones nerviosas de la dermis⁴⁸.

A partir de los años 40's se retomó el estudio de este linaje celular, pero ahora relacionándolas con un origen melanocítico⁴⁹. Se pensó que las CL eran melanocitos desgastados o que habían perdido su capacidad de sintetizar pigmentos y que migraban a estratos superiores, y junto con los queratinocitos, eran descamadas. Esta teoría tenía su fundamento en que ambas células son dendríticas, residen en la epidermis (siendo los melanocitos basales y las CL suprabasales), además de que ambas reaccionan con algunas sales metálicas: los melanocitos son argentafines mientras que las CL son aureofilicas. Esta teoría fue desechada porque, al estudiar la ontogenia de los melanocitos, se observó que las CL ya estaban presentes en la epidermis mientras que los melanocitos todavía no se encontraban o se encontraban inmaduros. Además cuando se estudiaron ratones a los que se les habían removido experimentalmente las crestas neurales, se observó en la epidermis una ausencia de melanocitos mientras que las CL sí estaban presentes.

Finalmente Birbeck demostró notables diferencias ultraestructurales entre melanocitos y CL, ya que estas últimas son células con citoplasma claro, con una envoltura nuclear notoriamente plegada con abundantes surcos que ocasionalmente dividen al núcleo en lóbulos. Además cuentan con un tipo de gránulos constituidos por una porción vesicular y una discoide lo que en la microscopía electrónica de transmisión se observa como un bastón o una raqueta de tenis; actualmente a este organelo se le conoce como gránulo de Birbeck (GB)

y se sabe que participa activamente en la incorporación y procesamiento de los antígenos⁴⁷

En 1965 Billingham y Silvers mencionan por primera vez que las CL estaban implicadas en la actividad del sistema inmunológico ya que sugirieron que las CL podían capturar materiales antigénicos y tener un papel en la respuesta inmunológica primaria⁵⁰. Sin embargo, fue hasta los años 70's que se demostró que las CL participaban en reacciones de hipersensibilidad de contacto, además de que se podían encontrar abundantemente en vasos linfáticos de la dermis, por lo que se supuso que portaban antígenos hacia los ganglios linfáticos lo cuál se demostró al observar respuestas proliferativas de linfocitos después de estimular CL con distintos sensibilizadores⁵¹⁻⁵⁵.

Posteriormente, se demostró la presencia de marcadores de superficie característicos de células con funciones inmunológicas, tales como los receptores para el tercer componente del complemento (C₃) y la fracción cristalizable (Fc) de la IgG, mismos que comparten con linfocitos y macrófagos^{56,57}, así como la expresión de las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II)^{58,59}.

FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Ultraestructuralmente, las CL tienen forma irregular, presentan un citoplasma electrón lúcido por la ausencia de tonofilamentos y melanosomas, un núcleo marcadamente indentado, aparato de Golgi bien desarrollado y numerosas y pequeñas mitocondrias así como el característico GB en forma de bastón o raqueta de tenis,

En cuanto a su actividad enzimática, se caracterizan por presentar una fuerte actividad de adenosin-trifosfatasa de calcio y magnesio (ATPasa)⁶⁰. La técnica de histoquímica enzimática para la demostración de ATPasa es sencilla y reproducible: Dado que las únicas células positivas para esta técnica en epitelios escamosos son las CL, la histoquímica enzimática para ATPasa se considera específica para su demostración. Las CL también poseen actividad de esterasa inespecífica y de mieloperoxidasa, las cuales también se encuentran en macrófagos, sin embargo, las CL no poseen actividad de α -antitripsina y α -antiquimotripsina⁶¹.

Las CL expresan en su membrana una gran cantidad de proteínas relacionadas con el sistema inmunológico como el antígeno común leucocitario (CD45); las moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC I), las moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC II), siendo las CL las únicas células epidérmicas que constitutivamente las expresan⁶²; los antígenos CD1, que se dividen en CD1a, CD1b y CD1c y cuya función se relaciona con la presentación de antígenos de origen lipídico; el antígeno CD4, que es necesario para el reconocimiento del antígeno por el receptor de la célula T (TCR); los marcadores del linaje de MO/MQ CD14 y CD15 se han encontrado débilmente expresados en CL⁶³; la proteína ácida citoplásmica S-100 cuya función es modular el calcio intracelular⁶⁴; y los receptores para la Fc de la IgG y el C3b⁶⁵.

ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

En cuanto al origen de las CL se han realizado algunos trabajos en los que se ha demostrado que las CL derivan de la médula ósea^{66,67}, además que continuamente son reemplazadas por un "pool" de células precursoras migratorias originadas en la médula ósea. Aunque algunos investigadores han reportado producción de CL en bazo y ganglios linfáticos^{68,69}. Otros autores sugirieron que las CL están relacionadas al linaje de los monocitos /macrófagos (MO/MQ)⁷⁰, sin embargo su capacidad fagocítica es mucho menor que la de los macrófagos aunque comparten algunos marcadores de superficie como las moléculas CD4, receptores para C3, C4d, y C3b-C4b^{71,72}

En un estudio basado en el cultivo de células de origen mieloide, identificaron una subpoblación de células que dan origen a las CD, las cuales carecen de los marcadores del linaje de los linfocitos, son CD34+ y presentan el receptor para la Interleucina 3 α (α IL-3R) con lo que se destaca su ruta de diferenciación separada de otras células mieloides⁷³.

Recientemente se ha propuesto propuso que el linaje de las CD esta íntimamente relacionado con el de los MO/MQ ya que ambos tipos celulares tienen un mismo precursor, el que puede seguir dos rutas de diferenciación, una que lleva hacia monocito y posteriormente a macrófago y otra que lo lleva hacia CD^{74,75}. En la primera ruta destacan la posibilidad de que un monocito se diferencie en CD o en MQ, pero ambos tipos celulares pueden en un momento dado

cambiar de MQ a CD indistintamente, según sean las condiciones microambientales así como de las necesidades del individuo en ese momento. Así, las CD y los MQ representarían los extremos de una misma familia, ya que mientras los MQ cuentan con una gran capacidad fagocítica y su capacidad para realizar la presentación antigénica es poca, en las CD sucede lo contrario, ya que tienen poca capacidad fagocítica y una gran capacidad como células presentadoras de antígenos. (Fig. 1).

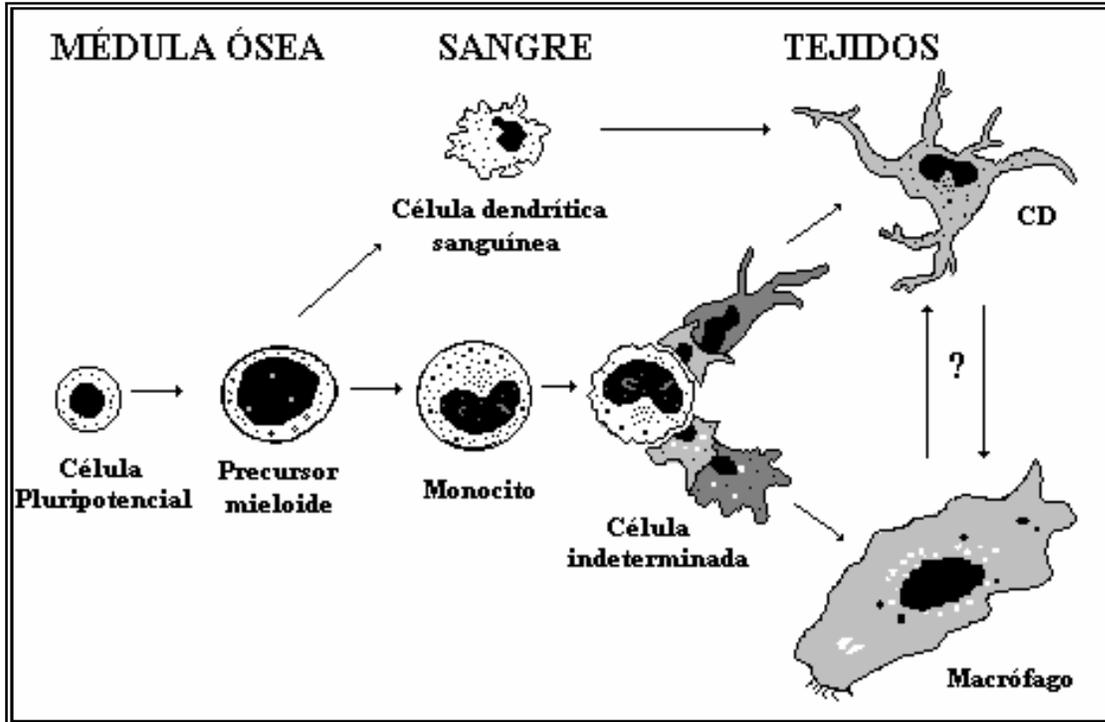


Figura 1. Esquema que destaca dos principales vías de origen de las CD a partir de precursores de médula ósea.

SISTEMA DE CELULAS DENDRITICAS

Las células de este sistema se localizan en órganos linfoides y no linfoides, así como en la circulación, ya sea linfática o sanguínea. Las células progenitoras de las CD se originan en médula ósea, estas dan lugar a las células precursoras circulantes que se dirigen a los distintos tejidos donde residen como células inmaduras con una elevada capacidad fagocítica. Al presentarse un daño tisular, las células inmaduras capturan a los antígenos y posteriormente migran hacia los órganos linfoides, donde seleccionan células T específicas a dichos antígenos permitiendo la iniciación de respuestas inmunes. En este sentido, las CD presentan antígenos a linfocitos CD4+ que regulan a los efectores inmunológicos, incluyendo linfocitos CD8+ y células B así como macrófagos, eosinófilos y células

NK. Además las CD instruyen a las células efectoras para dirigirse a los sitios afectados. En este sentido, podríamos clasificar a las CD's por su estado de desarrollo como progenitoras de CD que patrullan sangre y linfa, precursoras de CD que pueden reconocer patógenos y liberan grandes cantidades de citocinas como IFN- α , limitando la dispersión de la infección, CD inmaduras residentes de tejidos que poseen una alta capacidad endocítica permitiendo la captura de antígenos y CD maduras presentes en órganos linfoides secundarios que expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras permitiendo la presentación antigénica. (Fig.2).

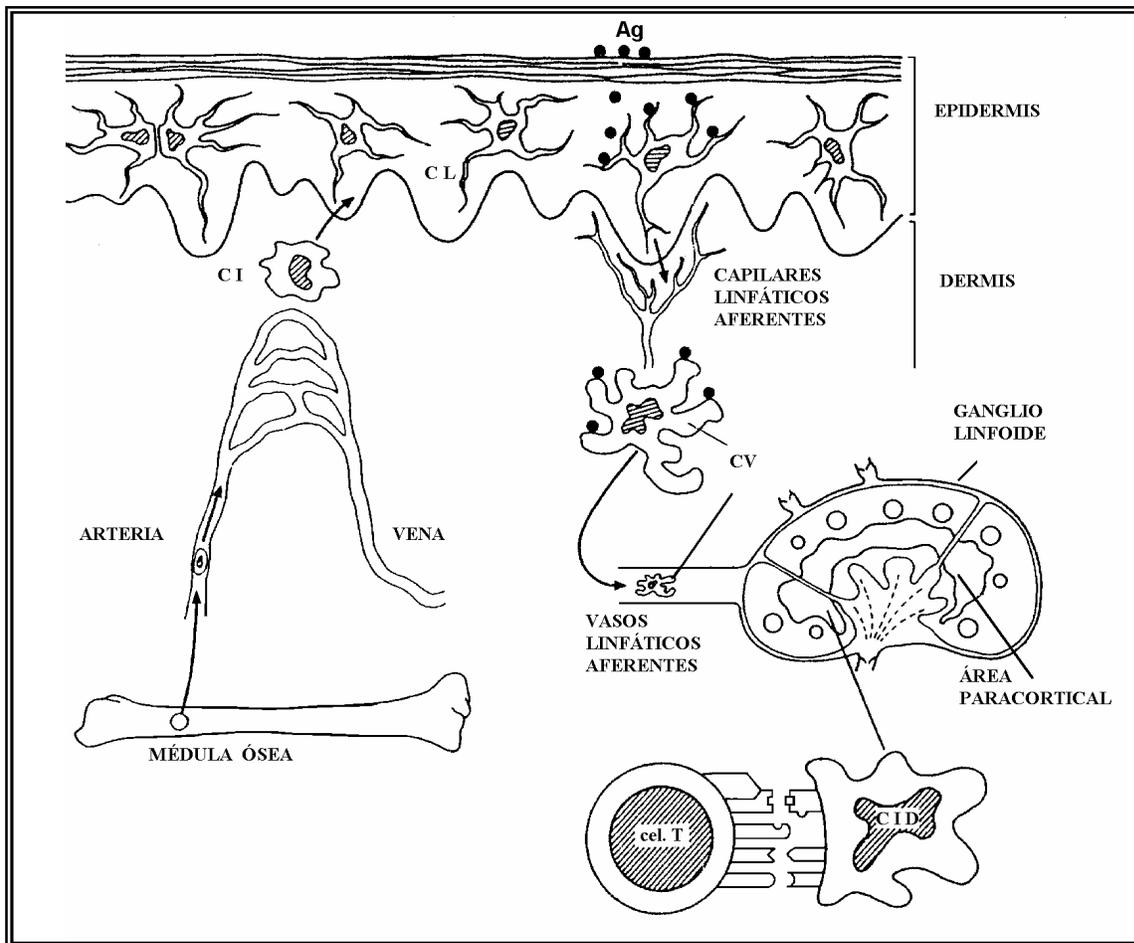


Figura 2. Vía de diferenciación que siguen las CD desde su origen hasta la presentación antigénica en la paracorteza de ganglios linfoides.

CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS (CL). Se localizan basal o suprabasalmente en la epidermis y ocasionalmente se observan en la dermis; presentan proyecciones citoplásmicas pudiendo llegar a formar redes, muestran actividad de ATPasa, esterasa inespecífica, y expresan fuertemente moléculas clase II del CPH y presentan receptores para el Fc de la IgG y para el C3b. En cultivo su tamaño aumenta casi al doble, a la vez que aumenta la expresión de moléculas clase II del CPH y de moléculas de adhesión, pero carecen del característico GB, y de los receptores para Fc de IgG, y por ello asemejan a las CD sanguíneas o linfoides.^{43,76, 77}

CÉLULAS VELADAS. Su nombre se debe a que presentan grandes proyecciones citoplásmicas en forma de velos; se localizan en la linfa, únicamente en los vasos linfáticos aferentes, siendo alrededor del 50% de la población celular de los vasos linfáticos y en general presentan características análogas a las CL. Al igual que las demás CD su actividad fagocítica es baja en contraste con su alta actividad presentadora de antígenos, y solamente un bajo porcentaje cuentan con el característico GB. En sangre, menos del 0.1% del total de las células presentan características dendríticas, siendo éstas, las únicas que pueden presentar velos retráctiles.^{43,76, 77}

CÉLULAS INTERDIGITANTES. Este subtipo celular se encuentra en las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos y en la médula del timo. Su nombre se debe a que forman interdigitaciones entre sus proyecciones y las de los linfocitos T con los que se encuentran en íntima aposición para realizar la presentación antigénica. Como las demás células del sistema presentan características análogas a las CL, pero su actividad de ATPasa y la cantidad de receptores para Fc y C3b es menor, contrastando el aumento en la expresión de moléculas clase II del CPH.^{43,76, 77}

CÉLULAS DENDRÍTICAS ESPLÉNICAS. Las células de Steinman y Cohn, a diferencia de las demás CD, carecen del característico GB, de la actividad de ATPasa y de receptores para el Fc de las IgG y el C3b. Se encuentran en grandes cantidades en la vaina periarteriolar de los vasos (zona T-dependiente) y expresan fuertemente la proteína S-100 y las moléculas clase II del CPH. En este órgano las CD son similares a las del timo pero de menor tamaño.^{43,76, 77}

CÉLULAS DENDRÍTICAS INTERSTICIALES. También se han descrito CD en el intersticio de algunos órganos como corazón, hígado, riñón, intestino y páncreas, con las mismas características de las CL. En estudios sobre trasplante de tejido cardíaco se observó, algunos días después y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para el donador, que las CD de éste colonizan el bazo del individuo receptor.^{43,76, 77}

CÉLULAS DENDRÍTICAS y CÁNCER

A pesar de los grandes avances con los que se cuenta en las terapias contra estados tempranos de cáncer, el pronóstico para los estados avanzados se ha mantenido estable durante los últimos 50 años. Sin embargo una gran variedad de estrategias han sido introducidas, la mayoría se han basado en los nuevos conocimientos que se tienen acerca de las características inmunológicas de los diferentes tumores.

En un principio, la inmunoterapia contra el cáncer se enfocaban solamente en la IL-2 y otras citocinas activadores de linfocitos T citotóxicos, específicos contra AAT: Estos ensayos tuvieron cierto éxito con regresiones tumorales, aunque fallaban en el control de estados avanzados. La activación efectiva de linfocitos T depende en gran medida de la participación de CPA, así como de macrófagos, linfocitos B y fibroblastos. De estas células, sólo las CD pueden activar linfocitos vírgenes, característica orientó a distintos grupos de trabajo a utilizar CD para inducir respuestas inmunes contra AAT.

Debido a que son muy escasas y no se ha desarrollado la capacidad de cultivarlas en grandes cantidades no se han obtenido resultados terapéuticos significativos. No obstante, se ha logrado la diferenciación ex vivo de CD's con lo que las cantidades disponibles aumentan al igual que las posibles aplicaciones en inmunoterapia antineoplásica.^{39,42,78}

La participación de CL o CD en la presentación de antígenos cancerosos ha sido ampliamente discutida desde inicios de los 90, cuando se observó la presencia y aposición de éstas con células cancerosas de tejidos afectados⁷⁹; recientemente se estableció que las CL in vitro, a diferencia de lo que ocurre in vivo, estimulan la respuesta inmune mediada por linfocitos T, CD4+ ó CD8+, cuando han sido expuestas previamente a epítopes cancerosos^{80,81,82}.

Un problema generalizado en cuanto a la terapia de los distintos tipos de cánceres es el hecho de que presentan una alta variabilidad de antígenos por lo que el desarrollar protocolos de inmunoterapia, depende del aislamiento de antígenos constantes que puedan ser utilizados como proteína blanco de la

respuesta inmune, por ejemplo el antígeno prostático, o los antígenos MAGE del melanoma.

Es importante resaltar que las diferentes interacciones entre las células tumorales y el sistema inmunológico involucran tanto a un gran número de células como de mediadores, que pueden desarrollar mecanismos de regulación de escape inmunitario mediante la secreción de factores inmunosupresores⁸³⁻⁸⁷, lo cuál puede resultar en la modificación de la actividad de captación o presentación antigénica por parte de las CL. Aunque la mayoría de los tumores inducidos o transplantados son capaces de inducir una débil respuesta inmune, cada tumor en particular presenta antígenos específicos de ese tumor, los cuales no comparten con otros tumores incluso del mismo individuo y son característicos de los tumores inducidos químicamente como en los carcinomas epidermoides^{88,89}. Sin embargo, en melanomas inducidos químicamente se ha demostrado que algunos antígenos tumorales inducen una respuesta que provee protección contra otros melanomas^{90,91}. En este sentido, se han identificado algunos antígenos tumorales constantes de las células de melanoma como el MZ2-E⁹², el MZ2-D⁹³, ambos codificados por los genes de la familia MAGE^{94,95} así como los antígenos SK29aAb y SK29aAa codificados por el gen Melan-A^{93,96-99}.

Numerosos autores han estudiado la posibilidad de establecer una inmunoterapia basada en la utilización de CD, tanto de sangre periférica como de médula ósea, en la mayoría de los reportes se ha observado una reducción parcial del tumor, así como un fenotipo inmaduro de las CD infiltrantes en distintos tipos de tumores, como en cáncer de mama¹⁰⁰, carcinoma escamoso celular¹⁰¹, cáncer de cabeza y cuello^{102,103}, y en otros tejidos cancerosos humanos^{104,105}.

Como un dato interesante, se ha propuesto que la densidad de CL en el estroma del tumor se puede utilizar como parámetro de pronóstico de supervivencia¹⁰⁶. Más recientemente, se estableció que las CL in vitro, a diferencia de in vivo, estimulan la respuesta inmune mediada tanto por linfocitos T, CD4+ o CD8+, cuando han sido expuestas previamente a epítopes cancerosos⁸². En este sentido, es de notar que las células tumorales pueden regular un mecanismo de escape inmunitario por la secreción de factores inmunosupresores, ya sean producidos por las mismas células tumorales o por células adyacentes al tumor.

Estos factores incluyen a las prostaglandinas y a otros mediadores encontrados en el suero de pacientes cancerosos^{83,84,85}. Estos factores pueden producir un decremento en la expresión de moléculas del CPH, resultando una presentación antigénica defectuosa por las CL.

En los tumores cutáneos las CL como CPA participan en la iniciación de respuestas inmunológicas contra tumores en la epidermis, mientras que las CD dérmicas y macrófagos lo hacen en la dermis, Lo anterior ha sido demostrado en tumores inducidos químicamente, donde la proliferación de linfocitos T específicos a los antígenos tumorales¹⁰⁷ dependen de citocinas presentes como GM-CSF y TNF α ^{108,109}. Por otro lado, es ampliamente conocido que los queratinocitos producen TNF α e IL-1 β durante la hipersensibilidad de contacto, en este sentido, es posible que alteraciones en la producción de estas citocinas durante el desarrollo del tumor puedan influenciar a las CL alterando su capacidad de presentación de antígenos.

Aunque los tipos de respuesta inmunológica responsables del control del crecimiento de tumores permanecen inciertos, es probable que las respuestas celulares sean más importantes que las humorales, ya que linfocitos Th1 CD4+, los cuales secretan IL-2 e IFN- γ , son más abundantes en tumores en regresión que otros tipos de linfocitos. Entre otros mecanismos, posiblemente los linfocitos Th1 CD4+ induzcan una regresión de tumores mediante la producción de factores que lleven a la apoptosis de las células tumorales¹¹⁰.

En el caso de los tumores inducidos mediante carcinógenos químicos como el dimetilbenza-(α)-antraceno (DMBA) y el tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) se produce una depleción de CL epidérmicas, del 50% en los tres primeros días de la aplicación. Esta depleción de CL epidérmicas persiste si los cancerígenos se aplican semanalmente durante ocho semanas, hasta que se desarrolla un tumor epidérmico¹¹¹. Otros trabajos han demostrado que el otro 50% de las CL que han quedado en la epidermis, 4 días después de la aplicación de DMBA y TPA, son incapaces de inducir proliferación de linfocitos T antígeno específicos, captan menos antígenos, fallan en la producción de IL-1 α , y tienen una reducida expresión de la molécula coestimuladora B7-2. Estas alteraciones en las CL también se han observado en la carcinogénesis inducida por UVB^{112,113}.

En los distintos tipos de cáncer la instalación de una respuesta inmune contra las células cancerosas es un punto crucial para el progreso de la enfermedad. Diversos autores han analizado el número y función de las CD en diferentes cánceres, encontrando una disminución, ya sea en la densidad de CD en el tumor o la presencia de CD inmaduras para montar respuestas inmunológicas.

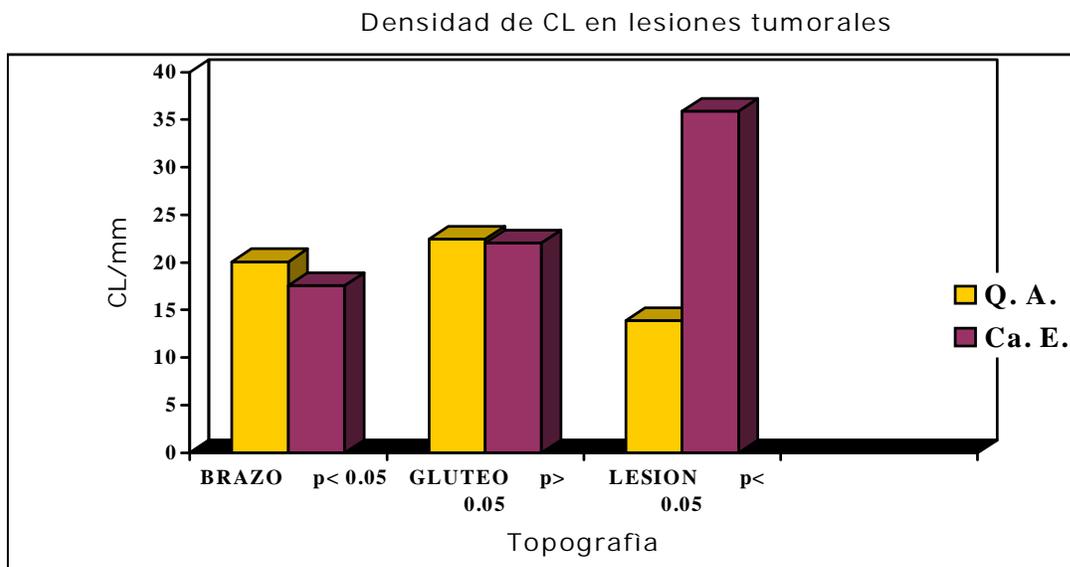
En este sentido, mediante la utilización de una población de CD sanguíneas generó células T CD8+ específicas contra el antígeno específico del tejido prostático (PSA), lo cual generó una destrucción de células tumorales prostáticas¹¹⁴. En otro ensayo de inmunoterapia contra el cáncer de próstata, analizó la posible utilización de CD pulsadas con los péptidos PSM-P1 y PSM-P2 obtenidos de células cancerosas, encontrando que aquellos pacientes que recibieron CD pulsadas con los péptidos tuvieron una disminución de PSA sérico¹¹⁵, mientras que los individuos a los que se les inyectaron los péptidos aislados o que solamente recibieron CD no pulsadas con los péptidos no tuvieron disminución del PSA sérico.

En algunas variedades de células cancerosas se ha inducido apoptosis debido al ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF (TRAIL), demostrando que las CD sanguíneas CD11c+ expresan TRAIL después de ser estimuladas con interferón alfa o gama y adquieren la habilidad de matar a las células tumorales que son TRAIL-sensitivas y no así a las TRAIL-resistentes o tipos celulares normales. Lo que sugiere que el TRAIL puede servir como una molécula efectora en las CD CD11c+ para la eliminación de células tumorales que se desarrollen espontáneamente^{116,117}.

En otros estudios, en pacientes con melanoma a los que se les aplicó una inyección semanal de 1 a 3 x10⁶ CD pulsadas con antígenos sintéticos de melanoma, se observó que en uno de ellos la respuesta a la inyección de CD fue completa y la infiltración de células T y CD en la lesión fue notoria; La misma respuesta se ha observado en pacientes con melanoma, carcinoma de cabeza y cuello y cáncer de mama a los que se les han aplicado inyecciones de fibroblastos productores de IL-12¹¹⁶. Por otro lado, en pacientes con leucemia aguda y crónica detectó la ausencia de las signal-regulatory proteins (SIRP) en monocitos, CD, granulocitos y células mieloides CD34+, CD190+ y AC133+ en contraste con la de individuos sanos. Aparentemente, el ligando de las SIRP es el

CD47, por lo que se concluyó que probablemente la adhesión celular juegue un papel muy importante en los mecanismos de escape inmunológico del tumor¹¹⁸.

En nuestro laboratorio, trabajando con lesiones premalignas (queratosis actínica) y malignas (carcinoma epidermoide) y utilizando como controles piel fotoexpuesta del brazo y piel no fotoexpuesta del glúteo evidenciamos un cambio en la densidad de CL en ambos tipos de lesiones: una disminución en la densidad de CL en la lesión premaligna, mientras que en la lesión maligna encontramos una densidad elevada de éstas células^{119,120}. (Gráfica 1.)



Gráfica 1. Comparativo de la densidad de CL en tumores premalignos (queratosis actínica) y tumores malignos (carcinoma epidermoide) donde se analizaron dos grupos controles de piel fotoexpuesta y no fotoexpuesta pertenecientes a los mismos individuos¹¹⁹.

Todos estos estudios que utilizan CD no epidérmicas presentan dos problemas operativos importantes: en primer lugar la dificultad para la obtención purificada de CD a partir de sangre y/o médula ósea, en términos de infraestructura; en segundo lugar, una eficacia disminuida en términos de estimulación antigénica debido al fenotipo inmaduro de las CD así obtenidas.

Considerando que las CL tienen un grado de maduración significativo en términos de procesamiento antigénico, así como el hecho de que se encuentran

normalmente en grandes cantidades en la epidermis, que parece de fácil acceso, resulta curioso que hasta la fecha no se haya evaluado la capacidad de estas células para reconocer antígenos específicos de melanoma ni su capacidad para inducir respuestas inmunológicas contra células de melanoma. Desde luego, tampoco se ha determinado el patrón de citocinas que permite la participación in vitro de las CL contra el tumor.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si las CL, al igual que otras CD son capaces de inducir respuestas proliferativas de linfocitos T, al ponerlos en cultivo en presencia de antígenos tumorales de melanoma.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar si las CL en cultivo son capaces de inducir una respuesta proliferativa de linfocitos específicos contra antígenos tumorales de melanoma.
- Determinar en cocultivos de linfocitos con CL previamente pulsadas con antígenos tumorales aislados y con CL previamente expuestas a células tumorales integra:
 - a) Si la proliferación linfocitaria es similar.
 - b) Si varía la expresión de las moléculas clase II del MHC y las moléculas coestimuladoras B7

HIPÓTESIS

1. Al cultivar linfocitos con CL previamente expuestas a antígenos MAGE se observará una proliferación linfocitaria elevada.⁸³⁻⁸⁷

2. Al cultivar linfocitos con CL previamente expuestas a células de melanoma vivas se debe observar una proliferación linfocitaria baja.⁸³⁻⁸⁷

DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales.

Se utilizaron ratones singénicos de la cepa C57BL/6, haplotipo H-2^b de 8 semanas de edad y de 40 g de peso, provenientes de una cepa adquirida en laboratorios Harland. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del Depto. de Biología Celular y Tisular, alimentados con alimento purina Chow para ratones y

agua ad-libitum y se mantuvieron en ciclos de luz oscuridad de 12 hrs. y a una temperatura constante de 23 °C.

Suspensiones celulares.

Suspensión de células de Langerhans (CL). A ratones de la cepa C57BL/6 (5 por experimento) se les sacrificó por dislocación cervical, se les cortaron las orejas y la piel ventral, las cuales fueron sometidas a incubación con EDTA 0.02M durante 60min. a 37°C, previa depilación, y con la ayuda de pinzas y agujas se obtuvieron mecánicamente láminas epidérmicas.

Las láminas epidérmicas fueron incubadas en una solución de tripsina 0.25%, DNasa I 0.025% durante 30min. a 37°C para su digestión, tras la incubación se retiraron de la solución de tripsina y se colectaron en una coladera de acero inoxidable, mediante agitación por pipeteo y posterior frotación se obtuvo una suspensión de células epidérmicas, de la cuál se retiraron las células muertas mediante centrifugación en Ficoll Hipaque 1077, posteriormente se incubaron con un anticuerpo acoplado a esferas paramagnéticas dirigido contra moléculas clase II del MHC (Macs microbeads MHC-II, Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la suspensión se pasó a través de una columna paramagnética (MS+, Miltenyi), las células aisladas fueron colectadas y utilizadas en los experimentos de inducción de presentación antigénica.

Suspensión de linfocitos T. Se colectó la sangre de 5 ratones (1 ml/ratón) y mediante un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hipaque se aislaron células mononucleadas. Las células obtenidas con el procedimiento anterior se colocaron durante dos horas en una botella de cultivo para que los monocitos/macrófagos se adhieran al plástico y los linfocitos se colectaron para los experimentos de presentación antigénica y proliferación.

Suspensión de células de melanoma. Se utilizó la línea celular B16-F10 de melanoma murino obtenida de la base de la oreja de un ratón C57BL/6 (Fidler IJ, Nature New Biol, 1972, 242:148). La línea celular fue expandida en botellas de 25cm² (RPMI 1640 adicionado con sulfato de gentamicina y amfotericina β) hasta obtener una monocapa. A cada botella se le retiro el medio y se le añadieron 2ml

de tripsina 0.5% 5 min. 37°C, finalmente se lavaron en medio de cultivo y se congelaron a -70°C (DMSO10% SFB 10% en RPMI) hasta su uso.

Extracción de antígenos tumorales.

Se tomaron 5×10^6 células de la línea B16-F10 y fueron lisadas mediante incubación en un buffer de lisis RIPA durante 30min a 4°C, posteriormente se realizó una homogeneización y se dejó incubar en RIPA durante 30min a 4°C, a continuación se centrifugaron a 10,000 g durante 10min. y se desechó el botón que contiene los restos celulares.

El sobrenadante que contenía las proteínas se concentró mediante centrifugación en tubos Amicon Ultra 4 que dejan pasar moléculas por debajo de 10,000 kilodaltons. Finalmente los antígenos MAGE fueron aislados al hacer pasar el concentrado de proteínas a través de una columna de alta afinidad de Proteína A (ImmunoPure® (Protein A) IgG Purification Kit, Pierce Co.) acoplada con un anticuerpo policlonal anti-MAGE.(Santacruz fl-309) Este anticuerpo reconoce a todos los antígenos de la familia MAGE.

Activación de CL.

Las CL obtenidas mediante el proceso de aislamiento descrito anteriormente presentan un inmuno-fenotipo "inactivo", por lo que para activarlas se adicionó al medio de cultivo con factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos 1µg/ml (GM-CSF) y se dejaron cultivar por 48 hrs. En esta condición se colocaron 1×10^5 CL por pozo en placas de cultivo de 1ml/pozo. Una vez que recuperan su condición de captación de antígenos, las CL fueron estimuladas ya sea con células tumorales vivas en una proporción 1:10 (CL:B16) o bien con antígenos tumorales MAGE aislados (50µg/ml) durante 48hrs.

Presentación antigénica:

Tanto los cultivos de CL activados con células tumorales vivas como con antígenos aislados fueron co-cultivados con 5×10^5 linfocitos T aislados el mismo día de su utilización.

Como controles a los dos grupos anteriores se utilizó un co-cultivo de CL sin estimulación y linfocitos, y uno con CL activadas con un antígeno no relacionado como el dinitrofluorobenceno (DNFB).

Un grupo control necesario fue la estimulación de linfocitos con fitohemaglutinina. En donde se tomó el índice de proliferación de linfocitos 100% y se comparó con el índice de proliferación de los otros grupos experimentales.

Cuantificación de la respuesta proliferativa de linfocitos.

En los grupos de cultivos donde se llevó a cabo la presentación de antígenos se evaluó la proliferación linfocítica por inmunohistoquímica mediante la utilización de un anticuerpo anti-PCNA. Este anticuerpo identifica a la proteína PCNA, la cual es una ciclina que dirige la división celular, donde las células PCNA+ corresponden a linfocitos en división. El número de células positivas se cuantificó y se expresó el índice mitótico de los linfocitos en cada grupo experimental y control. Para esto se contaron 100 células por campo, con un mínimo de 100 campos por ensayo contando al menos 1000 linfocitos que incluían tanto a los pCNA+ como pCNA-.

Manejo estadístico

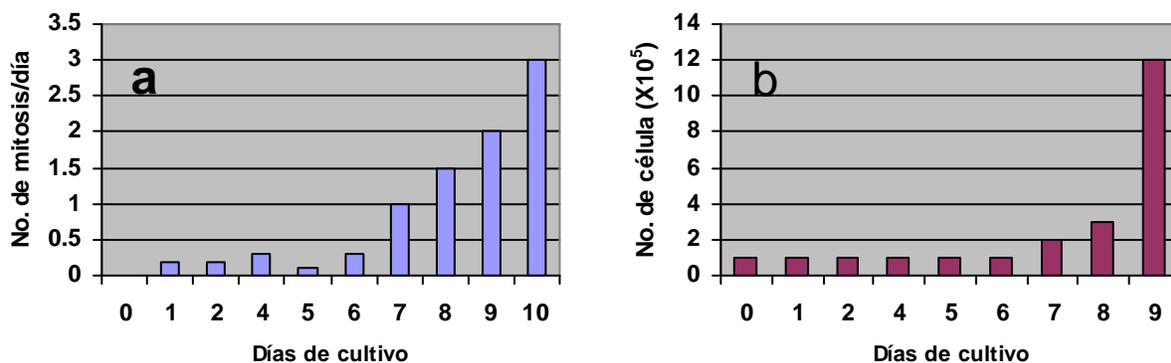
Todos los datos obtenidos fueron procesados para obtener su estadística descriptiva y se les aplicó la prueba de normalidad "Ómnibus de D'Agostino", posteriormente se les aplicó una prueba de análisis de varianza de una sola vía "ANOVA" y finalmente se les realizó una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico SPSS V.12.0 (Apache Software Foundation)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN Y EXPANSIÓN DE LA LÍNEA CELULAR B16

La línea de melanoma B16-F10, fue mantenida en congelación en alícuotas de $1-2 \times 10^5$ cels./ml en DMSO 10% en ABS/RPMI, tras ser descongeladas se mantuvieron en condiciones de crecimiento y hasta después de 7 días recuperaron su actividad mitótica. De cada alícuota descongelada se obtuvieron, en aproximadamente 10 días alrededor de 20×10^6 células de las que se tomaban aproximadamente 1×10^5 células para volver a ser sembradas y tener una producción aproximada de 20×10^6 cada 3 días. (Gráfica 2)

PROLIFERACION DE LA LINEA CELULA B16



Gráfica 2. En a) se observa la tasa mitótica que alcanzan los cultivos de la línea celular B-16 durante los primeros 10 días después de ser sembrados, a partir del séptimo día de cultivo la tasa de mitosis. En b) se gráfica el número de células de la línea B-16 que se pueden obtener por cultivo, nótese que para el 9°. Día de cultivo se pueden obtener números elevados de células de melanoma.

Por otra parte se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína S-100, tanto en cultivos tripsinados como en no tripsinados, encontrando un 99% de células positivas (Fig.3). Esta proteína es característica

de los melanocitos, y otras células con proyecciones citoplásmicas, por lo que se ha utilizado ampliamente en el diagnóstico de las células de melanoma.

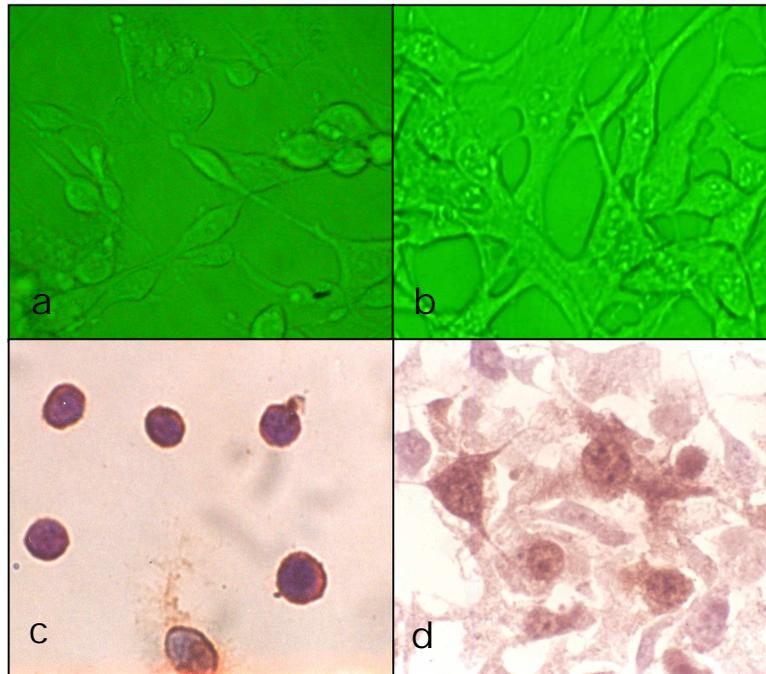
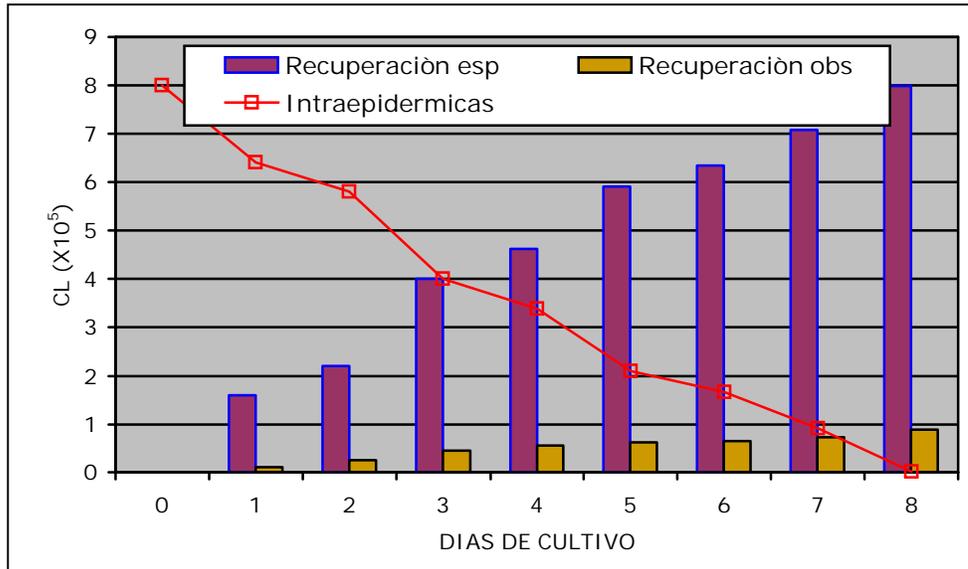


Figura 3. Cultivo de la línea celular B16-F10. a y c cultivos a las 2 horas después de las siembra, b y d cultivos a los 7 días después de la siembra. En las imágenes a y b se observa a los cultivos mediante contraste de fases; en c y d se realizó inmunohistoquímica dirigida contra la proteína S-100.

AISLAMIENTO DE CL

Aislamiento por migración. La primera de las técnicas desarrolladas en el proyecto para el aislamiento de CL fue mediante migración de láminas epidérmicas en cultivo. Para esto se separaron las láminas como se indica en el capítulo de diseño experimental, y posteriormente se dejaron en cultivo durante 8 días en RPMI suplementado con SFB 10% e IL-1. Como consecuencia a la presencia de IL-1 en el medio de cultivo se indujo una migración de las CL y a los 8 días se recuperó el sobrenadante y se obtuvieron las CL¹²¹. Para comprobar la migración se realizó en las láminas epidérmicas cultivadas una cuantificación de las CL restantes mediante inmunohistoquímica contra MHC II. Aunque en las láminas epidérmicas se observó una migración casi del 100% a los

8 días de cultivo (Fig. 4), solamente se recuperó alrededor del 10% de lo esperado, por lo que esta metodología fue desechada. (Gráfica 4)



Gráfica 4. Obtención de CL por inducción de migración mediante IL-1. Nótese que aunque la migración es constante y al 8o. Todas las CL han emigrado de la epidermis la recuperación se encuentra muy por debajo de lo esperado.

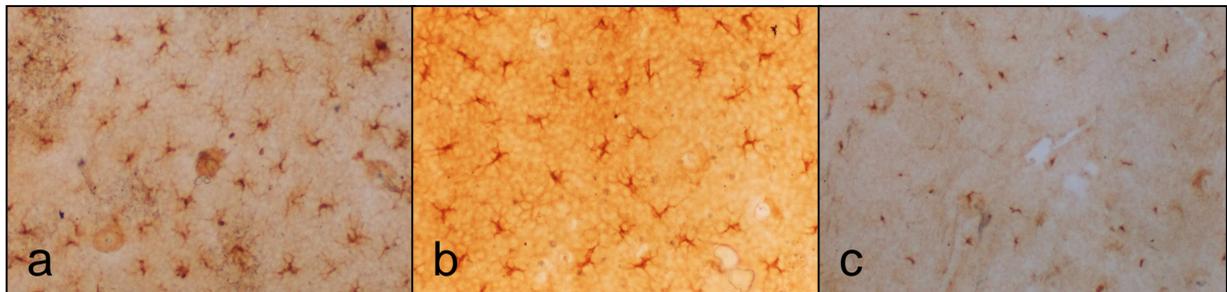


Figura 4. Inmunohistoquímica dirigida contra las moléculas clase II del MHC en láminas epidérmicas en cultivo a) 1 día; b) 3 días; c) 7 días.

Aislamiento por gradiente de densidad. Otra metodología que se ensayó para aislar CL fue la utilización de gradientes de centrifugación, de acuerdo a lo reportado por Peña Cruz¹²² en el 2002, en donde utiliza un gradiente de densidades de la siguiente manera 1.057g/ml, 1.068g/ml, 1.079g/ml, 1.090g/ml y

1.100g/ml. En metodologías anteriores se recomendaba para centrifugación usar Histopaque 1077 que es utilizado normalmente para separar células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo, con este gradiente los autores reportan una recuperación de 1 a 3 X10⁶ con una viabilidad superior al 90% y una pureza de entre el 80% y el 90%; una recuperación elevada si consideramos que en cada ensayo se utilizan 100 cm² de piel lo que nos da un aproximado de 4 X10⁶ CL. Los autores de esta técnica alcanzan dichas recuperaciones cuando hacen un combinado de las fracciones 2, 3 y 4, sin embargo en sus propios resultados se observa una variabilidad muy alta entre uno y otro ensayo, ya que tiene resultados que van desde 8.5 X10⁵ hasta 2.4 X10⁶ CL. (Fig. 5.)

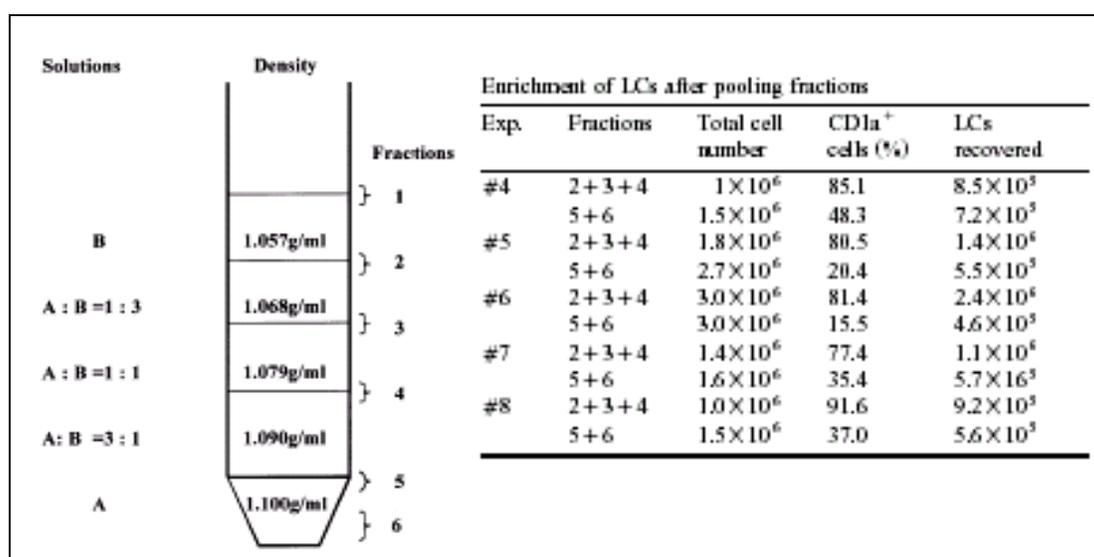
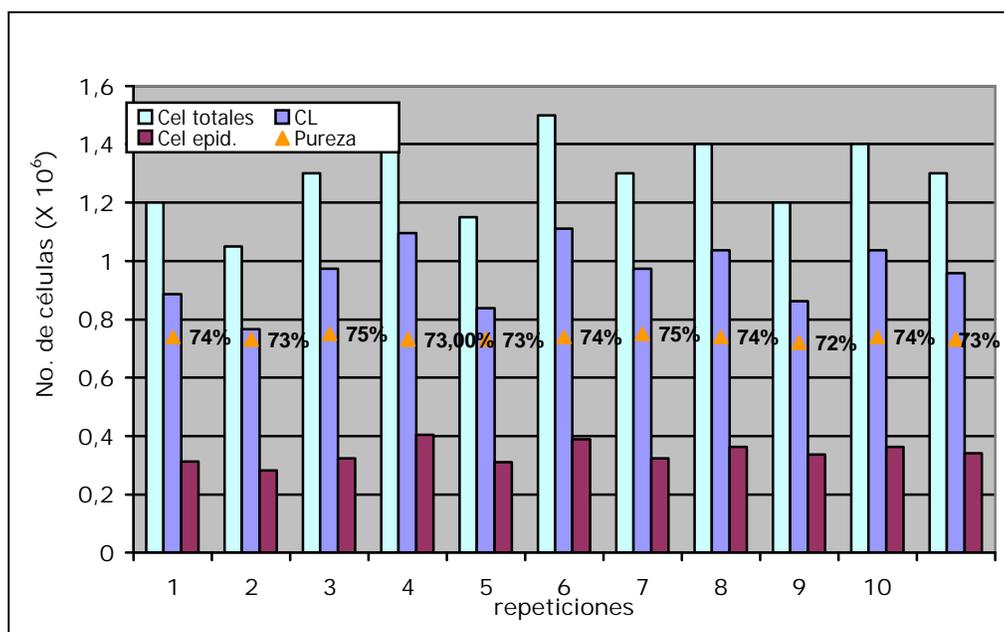


Figura 5. Esquema del gradiente de centrifugación y número de CL recuperadas por esta metodología.¹²²

Cuando aplicamos esta metodología, primero ensayamos tanto con piel ventral y dorsal como de oreja. Debido a que la densidad de CL es mucho mas baja en epidermis corporal, que en epidermis de oreja, además de que tiene una gran cantidad de tejido dérmico e hipodérmico, lo que hace mas difícil la separación de la epidermis, se decidió utilizar solamente piel de oreja, aunque con esto se tuviera que incrementar el número de animales a utilizarse por experimento. De acuerdo a lo indicado, se obtuvieron las láminas epidérmicas y se disgregaron hasta obtener una suspensión de células epidérmicas; posteriormente éstas fueron lavadas en RPMI y la suspensión fue colocada sobre el gradiente previamente preparado en un tubo de 15ml, y se centrifugó a 3000 rpm / 1h / temp. amb., los resultados obtenidos con esta metodología tampoco

fueron los adecuados, donde nuestra mejor separación fue de 1.3×10^5 (Grafica 5) pero con una pureza del 74%. Al realizar los experimentos de proliferación linfocítica se observó una respuesta proliferativa muy alta, aún cuando no se hubiera pulsado a las CL con algún antígeno, por lo que dicha respuesta inespecífica se atribuyó a la contaminación por otro tipo de células en los cultivos, razón por la cuál se optó por utilizar otra metodología en el aislamiento de CL.

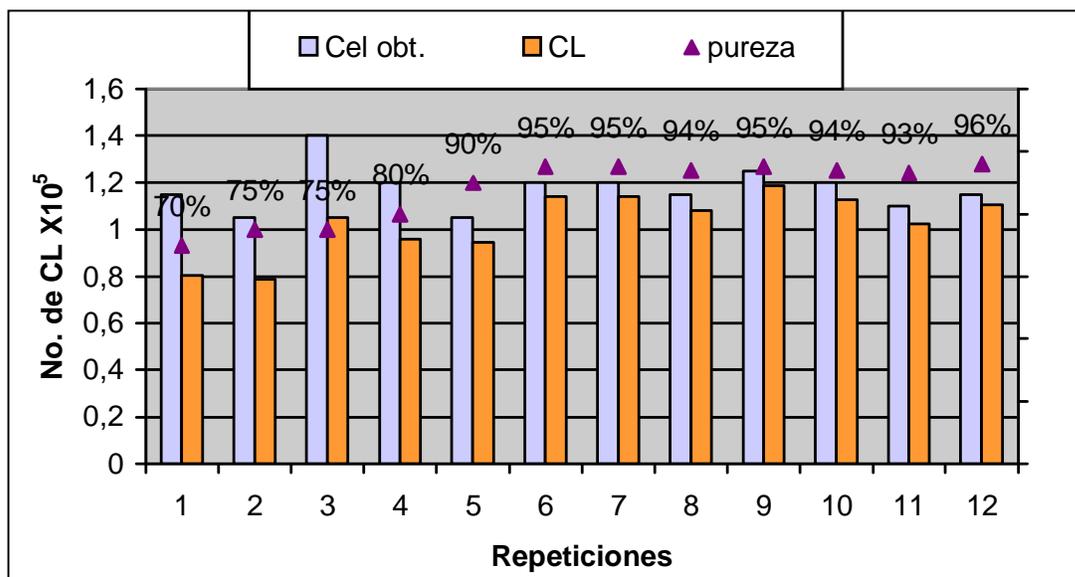


Gráfica 5. aislamiento de CL mediante la utilización de un gradiente de densidad. Las células totales obtenidas con esta metodología incluyen tanto a las CL como células epidérmicas. En todos los ensayos la pureza no rebasa el 75%.

Aislamiento por inmunofinidad. La última metodología ensayada para aislar CL fue la utilización de MACS, que consistió en incubar la suspensión de células epidérmicas con anticuerpos monoclonales anti-MHC II, acoplados a esferas paramagnéticas, posteriormente se hizo pasar la suspensión a través de una columna cuya matriz también contiene esferas paramagnéticas y mediante la utilización de un magneto las células marcadas con el anticuerpo se quedan en la

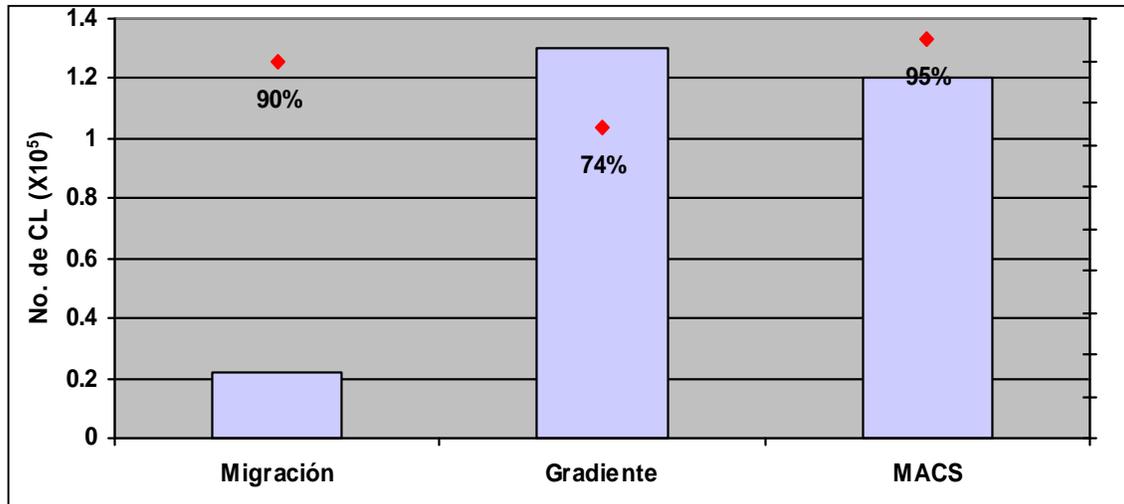
columna, posteriormente al retirarse el magneto, se deja fluir a la suspensión con CL aisladas.

Mediante esta metodología aunque obtuvimos una recuperación de CL no tan alta como en el caso del gradiente de centrifugación, alrededor de 1.2×10^5 , sí obtuvimos una elevada pureza, cercana al 95%, como se observa en la Gráfica 6.



Gráfica 6. Aislamiento de CL mediante metodología MACS. Con esta metodología recuperamos 1.2×10^6 CL con una pureza del 95%

Al comparar las distintas metodologías (Gráfica 7) utilizadas para el aislamiento de CL decidimos utilizar la separación mediante MACS, ya que con ella podemos aislar tantas células como en el gradiente de densidad, pero con una pureza del 95%, lo que nos permite durante la estimulación linfocítica reducir ampliamente la respuesta inespecífica debido a la contaminación por otros grupos celulares.



Gráfica 7. Comparación de las distintas técnicas de aislamiento de CL donde se observa el número de CL recuperadas y se pureza expresada en porcentajes, las CL se caracterizaron mediante inmunohistoquímica contra MHC II y B7.

PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS MAGE

Para el aislamiento de antígenos MAGE se cosecharon células de la línea de melanoma B16-F10 mediante tripsinación y posteriormente fueron lisadas, para la obtención de un concentrado de proteínas totales de acuerdo a como se describe en el capítulo de diseño experimental. Una vez obtenido dicho concentrado se pasó por la columna de afinidad (Fig. 6) constituida por una matriz de proteína A, la cuál tiene una alta afinidad por la Fc de IgG, y un anticuerpo policlonal anti-MAGE que reconoce a todas las proteínas integrantes de esta familia de antígenos, además este sistema de afinidad está reforzado mediante la utilización de disuccinimidil suberato (DSS) que forma un enlace covalente entre la proteína A y la porción Fc de los anticuerpos dándole mayor estabilidad a la columna de purificación. Tras el reconocimiento de los antígenos en la columna se eluyó la suspensión de proteínas y posteriormente se recuperó el antígeno purificado añadiéndole un buffer con pH=2 para disociar al complejo antígeno-anticuerpo, recuperando los primeros 5ml, posteriormente a la suspensión de antígenos se le restauró a pH=7.2.

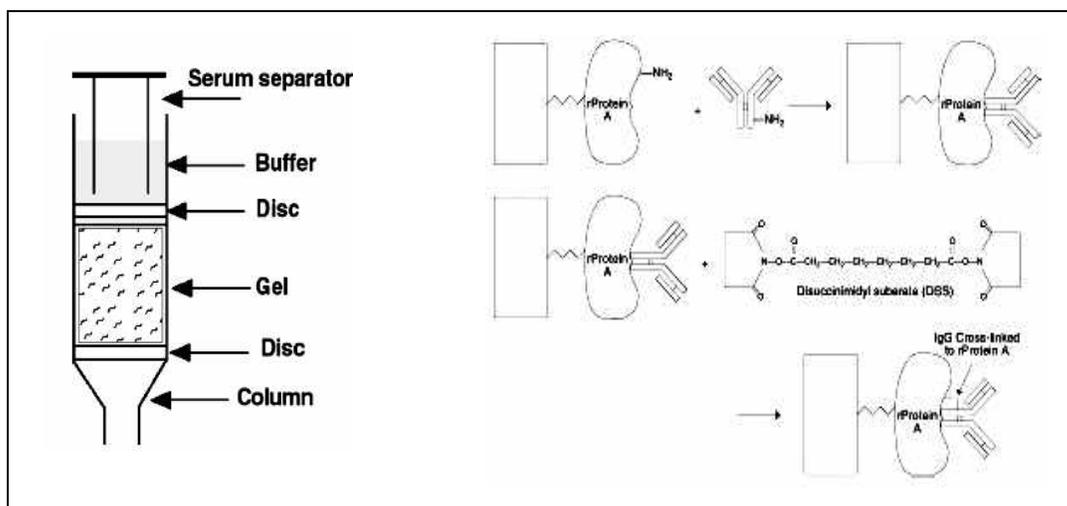


Figura 6. Esquema de la columna de afinidad utilizada para el aislamiento de antígenos MAGE ImmunoPure® (Protein A) IgG Purification Kit, Pierce Co.

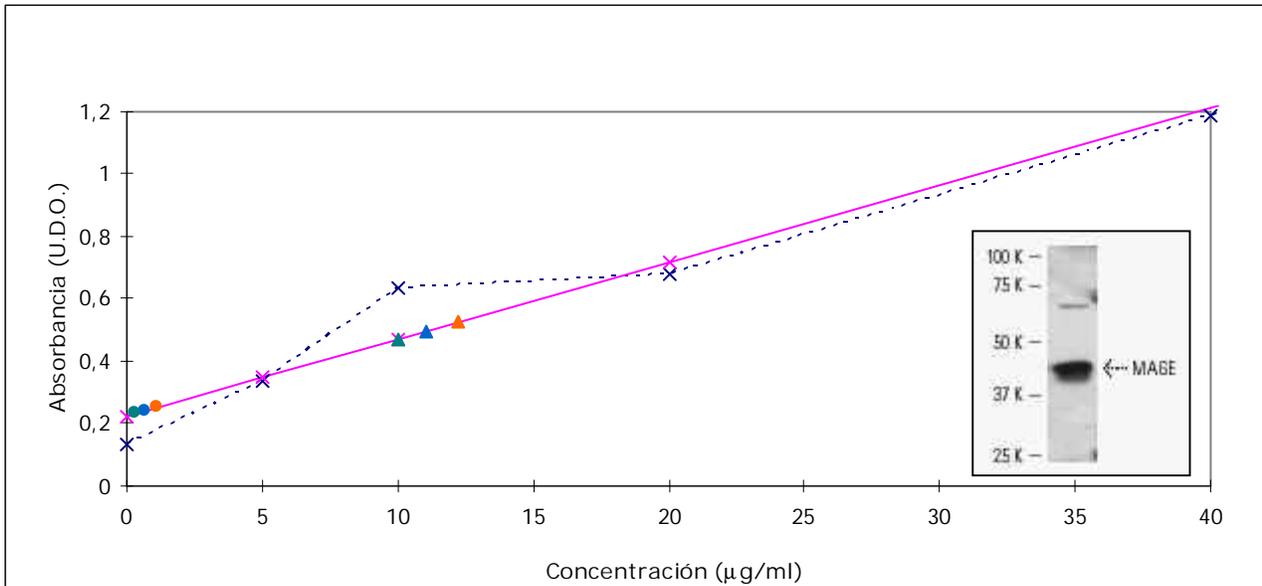
Con la finalidad de estandarizar el procedimiento de aislamiento de antígenos se ensayaron distintas concentraciones de células de melanoma a utilizar, así como los búferes de lisado. En la tabla 4, se resumen los distintos procedimientos ensayados.

Tabla 4. Aislamiento de antígenos MAGE utilizando dos tipos de Buffer de lisis y metodología de concentración, en todos los casos los Ag se aislaron mediante la columna Immunopure.

No. de cels. de Melanoma	Buffer de lisado	Método para concentrar proteínas	Concentración de proteína total	Concentración de MAGE
5 X10 ⁶	Glucosa	C. 10000rpm	152µg/ml	18.73µg/ml
5 X10 ⁶	Glucosa	C. AMICON	548µg/ml	68.6µg/ml
5 X10 ⁶	RIPA	C. 10000rpm	9025µg/ml	87.3µg/ml
5 X10 ⁶	RIPA	C. AMICON	1260µg/ml	105µg/ml

Para la cuantificación de los antígenos obtenidos se realizó la prueba de determinación de proteínas micro-Bradford y posteriormente mediante electroforesis se confirmó que la proteína aislada fuera MAGE, solamente por correspondencia con su peso molecular (Grafica 8). En los distintos ensayos que

se realizaron se obtuvo en promedio 105 $\mu\text{g/ml}$ de antígenos MAGE purificados a partir de 5×10^6 células B-16.



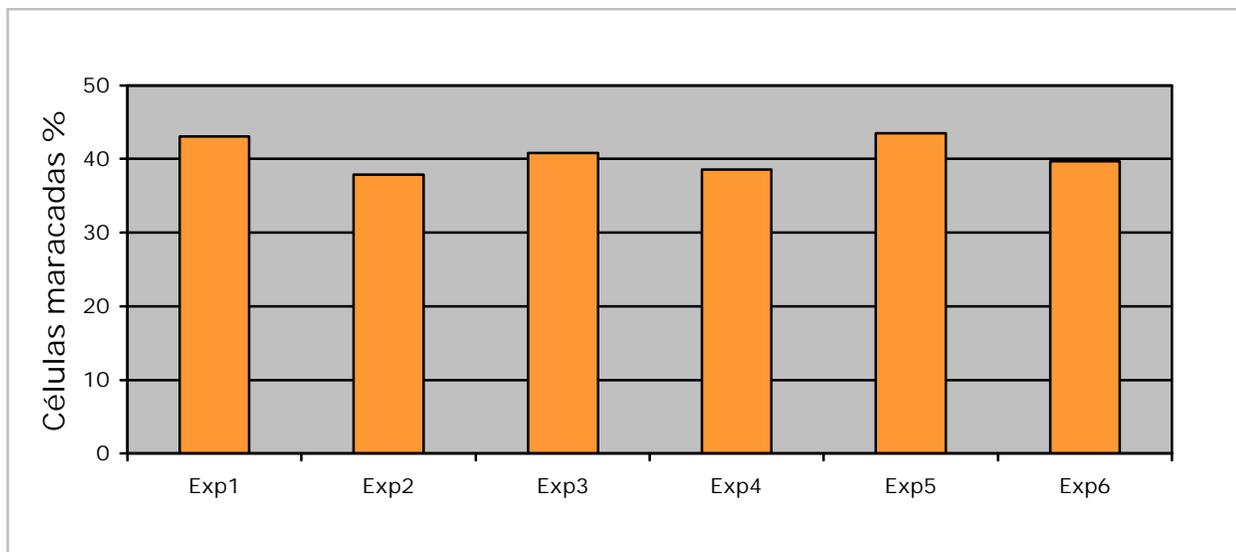
Gráfica 8. Determinación de proteínas mediante la técnica Micro de Bradford. La línea punteada representa una curva patrón de albúmina y la línea continua a su regresión lineal, los triángulos representan la proteína total y los círculos a los antígenos MAGE aislados. Ambos casos se encuentran en una dilución 1:100, para que se ajusten al rango de sensibilidad del ensayo. En el inserto se observa un gel de electroforesis en el que se corrió la solución eluida de la columna de purificación, donde se observa una banda gruesa entre 37 y 50 KD, que corresponde a los antígenos MAGE aislados.

ESTIMULACIÓN DE RESPUESTAS PROLIFERATIVAS DE LINFOCITOS

Como experimento previo para evaluar la estimulación de linfocitos por CL activadas. Se estimularon 5×10^5 linfocitos recientemente obtenidos de sangre periférica con fitohemaglutinina a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$ encontrando un índice de estimulación (IE) en todos los experimentos cercano al 40% Gráfica 9), lo que concuerda con lo reportando en la referencia del fabricante de fitohemaglutinina. La evaluación se realizó en extendidos de células cultivadas que fueron procesadas mediante inmunohistoquímica dirigida contra la ciclina pCNA.

En cada cultivo se evaluaron 3 laminillas contando 10 campos y en cada campo se contaron 100 células o bien 1000 células por experimento, incluyendo tanto a las pCNA+ como a las pCNA-.

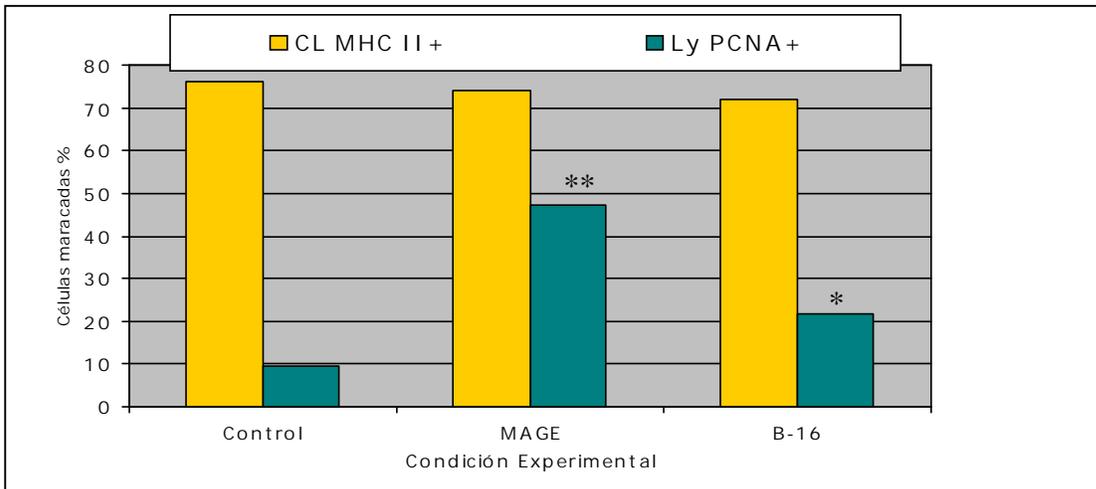
Estimulación de proliferación linfocitaria con fitohemaglutinina (1000 células por ensayo).						
	Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	Exp5	Exp6
pCNA+	431	379	408	386	435	397
pCNA-	569	621	592	614	565	603



Gráfica 9. Estimulación de proliferación linfocitaria con fitohemaglutinina expresada en porcentaje de cada 1000 linfocitos.

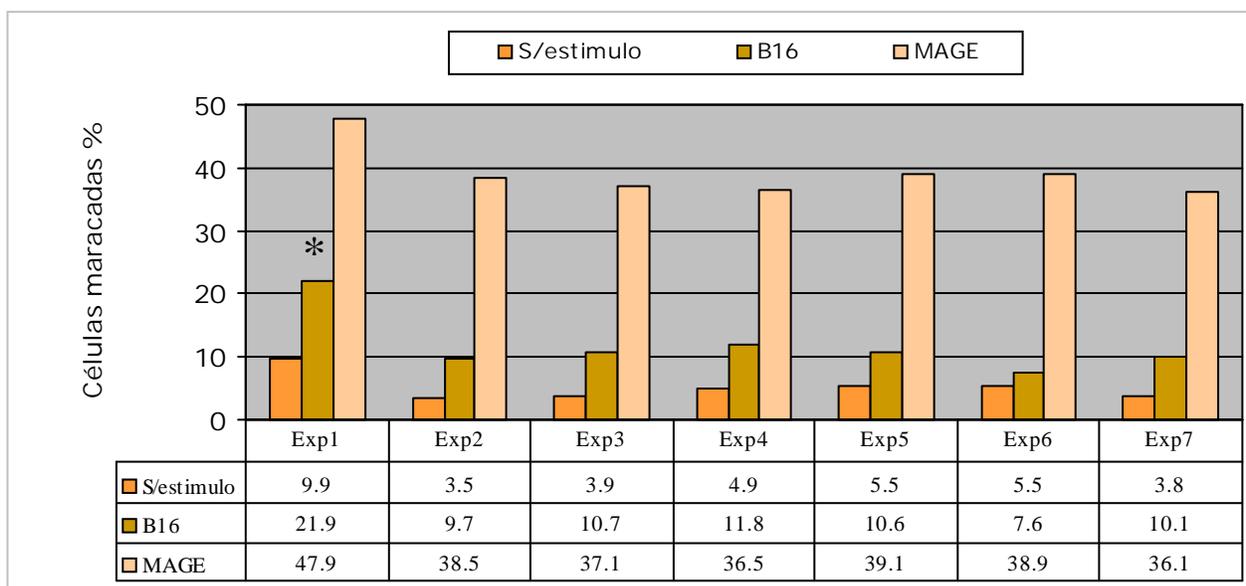
En los ensayos de presentación antigénica y proliferación linfocitaria se utilizaron 1×10^5 CL (previamente activadas con GM-CSF), que fueron estimuladas un grupo con $50\mu\text{g}$ de antígenos MAGE purificados y otro grupo con 1×10^6 células de la línea B16, después de cultivar a las CL durante 24 horas con su respectivo estímulo se añadió a cada pozo 5×10^5 linfocitos, mismos que se dejaron cultivar 24 horas y posteriormente se cosecharon los cultivos para realizar la evaluación del índice de estimulación (IE) de linfocitos mediante inmunohistoquímica dirigida contra la ciclina pCNA; de igual manera que en los cultivos de linfocitos estimulados con PHA se contaron por experimento un total de 1000 células en por lo menos 10 campos.

En cada experimento el IE de cada cultivo de linfocitos obtenido con PHA se consideró como el 100% y a partir de este se calculó el porcentaje de linfocitos que fueron estimulados por CL. (Gráficas 10 y 11)



Gráfica 10. En la siguiente gráfica se muestra el índice de estimulación obtenido con CL que fueron aisladas mediante la técnica de gradiente de densidad. Como se puede apreciar el índice de proliferación en el grupo control es del 9.5%, en el grupo de CL + MAGE del 47% y en el grupo CL+B16 del 21%.

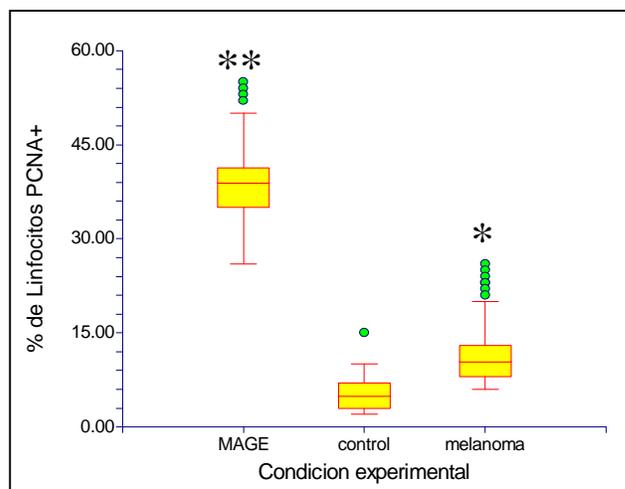
Al sustituir la metodología de aislamiento de CL mediante gradiente de densidad por la metodología MACS se obtuvo una mayor pureza de CL lo que esperábamos resultara en una disminución de la respuesta proliferativa linfocitaria inespecífica, (Gráfica 11), la respuesta inespecífica se abatió a la mitad aunque se mantuvo el mismo patrón proliferativo.



Gráfica 11. Proliferación linfocitaria estimulada por CL tanto en cultivos con antígenos MAGE como con células vivas B16.

En la gráfica anterior se observa como la respuesta proliferativa linfocitaria es 4 veces mayor cuando las CL fueron pulsadas con antígenos MAGE al aplicar un Análisis de Varianza entre las distintas repeticiones se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el experimento 1, (CL aisladas mediante gradiente de densidad, 74% de pureza) con respecto al resto de los experimentos (CL aisladas mediante MACS 95% pureza).

Cuando comparamos dentro de los experimentos y se agruparon todos los experimentos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos experimentales, entre sí y con el grupo control, como se observa en la Gráfica 12.



Gráfica 12. Diagrama de Caja en que se gráfica la proliferación linfocitaria en los distintos grupos experimentales, como se puede apreciar, tanto los cultivos pulsados con antígenos MAGE como los cultivos pulsados con células B16 guardan diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, según los estadísticos de comparación múltiple de Kruskal Wallis como de Bonferroni con una alfa de 0,05 y una Z de 1.96

CONCLUSION

La finalidad de este trabajo fué demostrar la habilidad de las CL epidérmicas para inducir respuestas proliferativas de linfocitos Ag-específicos, misma que ha sido ampliamente demostrada en CD sanguíneas y tisulares. Durante los mas de 10 años que ha atravesado el desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer basada en la utilización de células pertenecientes al SCD, la mayoría de los estudios se han hecho precisamente con CD sanguíneas, que constituyen un estado de desarrollo previo al de las CL.

Durante esta etapa de diferenciación se caracterizan por presentar una aceptable capacidad de captura de antígenos y prácticamente nula capacidad presentatoria, mientras que las CL epidérmicas, aunque actualmente también son consideradas como células inmaduras, presentan una capacidad de captura antigénica de 10 a 100 veces mayor que las CD sanguíneas y una vez que han captado dichos antígenos realizan una presentación antigénica, de manera similar a las CD presentadoras de antígenos derivadas de CD sanguíneas; siendo seleccionadas en la mayoría de los casos estas últimas no por sus superiores características funcionales en cuanto a la captación y/o presentación antigénica.

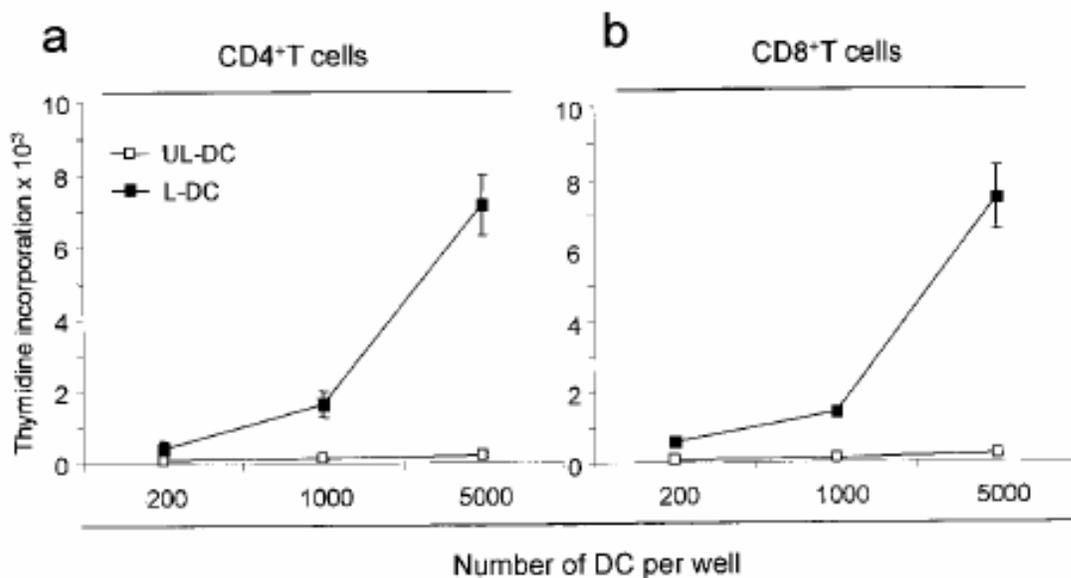
Con respecto a los demás integrantes de este linaje celular, sino por su fácil disponibilidad y elevados números que se pueden obtener, mientras que con las CD epidérmicas (CL) la disponibilidad de ellas es mucho menor y de mayor dificultad.

Con la metodología descrita en el presente estudio fuimos capaces de obtener una suspensión enriquecida de CL con una pureza del 95%, utilizando como criterio de aceptación a aquellas células MHC II+, lo que es superior a lo obtenido en reportes previos, donde alcanzan una pureza que oscila entre el 70 y el 90%^{121,122}, aunque los números de CL obtenidas no fueron superiores a 5×10^5 CL por experimento.

Actualmente el procedimiento se sigue optimizando. Sin embargo estos resultado son acordes o tan satisfactorios como los que han obtenido otros autores con CD sanguíneas, donde tras obtener sangre periférica se separan las

células mononucleares mediante centrifugación con Ficoll y posteriormente se desechan a las células no adherentes (diferenciadas), mientras que las adherentes se cultivan por 6 días en presencia de GM-CSF e IL-4 recuperando al 7° día de cultivo una suspensión de células CD1a+ $\geq 90\%$, y para estimular la maduración de las CD del día 5 al 7 se les adiciona el medio con CD40L^{123,124,125}.

En cuanto a la presentación antigénica pudimos determinar que las CL son buenas estimuladoras de respuestas proliferativas de linfocitos, como se representan en la gráfica No. 11, y al comparar nuestros resultados con otros estudios en donde utilizan CD sanguíneas, se puede observar un patrón de proliferación linfocitario similar, de lo que podemos concluir que la presentación antigénica obtenida en nuestros cultivos se está dando de manera adecuada^{123,125,126,127,128,129}



En la gráfica anterior obtenida del trabajo de Berard¹²³ se observa la inducción de proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, mediante la detección de incorporación de timidina cuando fueron co-cultivados con CD obtenidas de sangre periférica pulsadas y no pulsadas con células muertas de melanoma.

Así mismo evidenciamos que cuando las CL son pulsadas con antígenos tumorales purificados, MAGE, la respuesta proliferativa de linfocitos es al menos 4 veces mayor que cuando las CL son pulsadas con células de melanoma B-16 vivas. Esta diferencia en la estimulación proliferativa de linfocitos, posiblemente

se debe a que las células tumorales pueden estar secretando citocinas inmunosupresoras o bien que modulen negativamente a las CL, lo que confirmaría nuestra hipótesis, sin embargo, necesitamos realizar un mayor número de ensayos en los que determinemos las citocinas presentes en el sobrenadante del cultivo así como determinar que vías de señalización se están activando en las CL con la finalidad de establecer los mecanismo de modulación por parte de las células tumorales.

Una vez que hemos logrado determinar que las CL son igualmente potentes en la estimulación de respuestas específicas contra los antígenos MAGE que las CD de origen sanguíneo, tenemos que completar el presente estudio, para el futuro establecimiento de una inmunoterapia basada en la utilización de CL, mediante las siguientes propuestas:

- Eficientar el proceso de obtención de CL, ya que como se ha mencionado en capítulos anteriores una adecuada respuesta inmunológica depende ampliamente de un número elevado de CPA.
- En este mismo sentido, aislar y evaluar las distintas subpoblaciones de CL, ya que como se sabe no todas las CL son estimuladoras, sino que algunas subpoblaciones pueden inducir tolerancia a los antígenos tumorales, lo que tendría por resultado un crecimiento tumoral.
- Evaluar el patrón de citocinas producidas ya sea por las células tumorales o bien por las mismas CL, así como las vías de señalización que participan tanto en la estimulación como en la inactivación.

REFERENCIAS

- 1 Organización Mundial de la Salud. 2004. Tópicos de salud sobre Melanoma. http://www.who.int/health_topics/melanoma
- 2 Landis SH, T Murray, S Bolden, PA Wingo. 1999. Cancer J Clin Oncol 1999; 17(1):6-31.
- 3 Melanoma Education Foundation. 2004. http://www.skincheck.com/melanoma_education_foundation
- 4 Breslow A. 1970. Tumor Thickness, level of Invasion and Node Dissection in Stage I Cutaneous Melanoma. Ann Surg 182(5): 572-575, 1970.
- 5 American Cancer Society of Melanoma., 2004. http://www.cancer.org/docroot/esp/content/esp_5_1x_deteccion_y_sintomas_50.asp
- 6 Wang E., FM Marincola. 2000. A natural history of melanoma: serial gene expression analysis. Immunology Today 2000, 21 (12):619-23.
- 7 Kim CJ, DS Reintgen, CM Balch. 2002. The New Melanoma Staging System. Cancer Control Jan-Feb; 9 (1):9-15, 2002.
- 8 Mihm MC. 1971. The clinical diagnosis, classification and histogenetic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas. N Eng J Med 284: 1078-1082, 1971.
- 9 Cotran RS, V Kumar, SL Robbins. 1995. "Robbins Patología Estructural y Funcional", Ed. McGraw-Hill, 5ª edición, Madrid España, 1995.
- 10 Whittaker S. 2000. Adjuvant therapy in melanoma. Clin Exp Derm 25, 497-502, 2000.
- 11 Sampedro-Carrillo EA, TI Fortoul van der Goes, AE Castell-Rodríguez AE, JJ Abad-Moreno. 2001. El ganglio linfático centinela en el cáncer de la mama. Rev. Fac Med UNAM, 2001, 44(6)(Nov-Dic): 248-254.
- 12 O'Day SJ, CJ Kim, DS Reintgen. 2002. Metastatic Melanoma Chemotherapy to Biochemotherapy. Cancer control 2002, 9, (1): 31-38.
- 13 Sotomayor MG, H Yu, S Antonia, EM Sotomayor, DM Pardoll. 2002. Advances in gene therapy for malignant melanoma. Cancer Control, 2002, 9(1):39-48.
- 14 Lode HN, R Xiang, U Pertl, E Forster, SP Schoenbeger, SD Gillies, RA Reisfeld. 2000. Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4+ T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction. J Clin Invest, 105,1623-30, 2000.
- 15 Smith KJ, H Skelton. 1999. Immune and gene therapy for melanoma, and the immunobiology of melanoma. International Journal of Dermatology, 38, 490-508, 1999.
- 16 Smith C, V Cerundolo. 2001. Immunotherapy of melanoma, Immunology 104, 1-7, 2001.

- 17 Hara I, N Sato, H Miyake, M Muramaki, S Hikosaka, S Kamidono. 2004. Introduction of 65kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG Therapy. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48(4):289-295.
- 18 Parish, CR. 2003. Cancer immunotherapy: The past, the present and the future, *Immunology and Cell Biology* (2003) 81, 106–113
- 19 Coley, WB. 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893; 105: 487-511
- 20 Ehrlich P.1909. Uber den jetzigen Stan der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde* 1909; 4: 129-38
- 21 Woglom WH. 1929. Immunity to transplantable tumours. *Cancer Res.* 1929; 4: 129–38.
- 22 Burnet FM. 1967. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967; 1: 1171–4.
- 23 Ossendorp F, Mengede E, Camps M, Filius R, Melief CJ. 1998. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 693–702.
- 24 Dummer W, AG Niethammer, R Baccala, BR Lawson, N Wagner, RA Reisfeld, AN Theofilopoulos. 2002. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity *J. Clin. Invest.* 110:185–192 (2002).
- 25 Gutzmer R, Guerry D. 1998. IV. Gene therapy for melanoma in humans. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998;12:519-538.
- 26 Linder M, Schirmacher V. 2002. Tumor cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethilen-glycol versus electro-fusion protocols. *European Journal of Clinical Investigation.* 32(3):207-217, 2002
- 27 Butterfield LH, SM Jilani, NG Chakraborty, LA Bui , A Ribas, VB Dissette, R Lau, SC Gamradt, JA Glaspy, WH McBride, B Mukherji, JS Economou. 1998. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161(10):5607-13.
- 28 Butterfield LH, TC Stoll, R Lau, JS Economou. 1997. Cloning and analysis of MART-1/Melan-A human melanoma antigen promoter regions. *Gene.* 1997 Jun 3;191(2):129-34
- 29 Dhodapkar MV, N Bhardwaj. 2000. Active Immunization of Humans with Dendritic Cells. *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 20, No. 3, 2000
- 30 Bachleitner-Hofmann T, A Stift, J Friedl, R Pfragner, K Radelbauer, P Dubsy, G Schuller, T Benko, B Niederle, C Brostjan, R Jakesz, M Gnant. 2002. Stimulation of Autologous Antitumor T-Cell Responses Against

- Medullary Thyroid Carcinoma Using Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells (J Clin Endocrinol Metab 87: 1098–1104, 2002)
- 31 Metcalf KS, PJ Selby, LK Trejdosiewicz, J Southgate. 1997. Interferon-induced changes in human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 1997; 7: 355-363.
 - 32 Berke G, S Keidar, J Li, I Markon, D Ronen, D. Rosen. 2000. Tumor immunity and autoimmunity: regulation and function of death receptor Fas/CD95 and its ligand.
 - 33 Abbas AK, JS Pober, AH Lichtmann. 2003. Cellular and molecular immunology. Elsevier, 2003.
 - 34 Lee P, F Wang, J Kuniyoshi, V Rubio, T Stuges, S Groshen, C Gee, R Lau, G Jeffery, K Margolin, V Marty, J Weber. 2001. Effects of Interleukin-12 on the Immune Response to a Multipeptide Vaccine for Resected Metastatic Melanoma *J Clin Oncol* 19:3836-3847. © 2001
 - 35 Curtsinger JM, Schmidt CS, Mndino A. 1998. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ cells. *J Immunol* 162:3256-3262, 1998
 - 36 Schmidt CS, MF Mescher. 1999. Adjuvant effect of IL-12: Conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T-cells in vivo. *J Immunol* 163:2561-2570 1999
 - 37 Koido S, Kashiwaba M, Chen D. 2000. Induction of anti-tumor immunity by vaccination with dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol* 165:5713-5719, 2000
 - 38 Divino CM, SH Chen, W Yang, S Thung, ST Brower, S Ada. 1999. Anti-tumor immunity induced by Interleukin-12 gene therapy in a metastatic model of breast cancer is mediated by natural killer cells *Breast Cancer Research and Treatment* 2000,60: 129–134.
 - 39 Rosenberg SA, MT Lotze, LM Muul, AE Chang, FP Avis, S Leitman, WM Linehan, CN Tobertson, RE Lee, JT Rubin, CA Seipp, CG Simpson, DE White. 1987. Progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987, 316, 889-897
 - 40 Rosenberg, S.A. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001, 411, 380-384
 - 41 Fushimi T; A Kojima, M Moore, RG Crystal. 2000. The Macrophage inflammatory protein 3[alpha] transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. *Journal of Clinical Investigation* 105(10) 2000,1383-1393

- 42 Banchereau J, RM Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392: 245-52.
- 43 Banchereau J, F Briere, C Caux, J Davoust, S Lebecque, Y Liu, B Pulendran, K Palucka. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells, *Annu Rev Immunol*, 2000, 18:767-811.
- 44 Langerhans 1868. Ueber die Nervender menschlicher. Haut. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 44: 325, 1868.
- 45 Kreibich, C. 1917. Nervenzellen der Haut, *Derm Syph.* 124,487. En: Schuller G. 1991 EPIDERMAL LANGERHASN CELLS. CRC Press, USA1991.
- 46 Ferreira-Marques J. 1951. Systema sensitivum intraepidermuc. Die Langerhansenschen Zellen als receptoren des hellen schmerztes: *Doloriceptoresw. Arch Derm Syph*, 193,191,1951.
- 47 Birbeck MS, AS Breatnatch, JD Everal. 1961. An electron microscopic study of the basal melanocyte and high level clear cell (Langerhans cell) in vitiligo. *J. Invest Dermatol* 37,51,1961.
- 48 Castell RA. ,1989. Caracterización morfológica de las células de Langerhans de anfibios. Tesis de Maestria en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM,México.
- 49 Masson P. 1948. Pigment cells in man *Ann NY Acad Sci* 4,15,1948
- 50 Billingham RE, WK Silvers. 1965. Some unsolved problems in the biology of the skin. En: Lyne AG, Short BF, Eds. *Biology of the skin and Hair Growth* . Sydney,1965.
- 51 Siberberg 1971. Studies by electron microscopy of epidermis after topical application of mercuric chloride. Morphologic and histochemical findings in epidermal cells of human subjects who do not show allergic sensitivity or primary irritant reactions to mercuric chloride (0.1 per cent). *J Invest Dermatol.* 1971 Feb;56(2):147-60.
- 52 Silberberg, I, RL Baer, SA Rosenthal. 1976. The role of Langerhaqns cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol* 66,210,1976.
- 53 Silberberg I, RL Baer, GJ Thorbecke. 1977. Langerhans cells. A review of their nature with emphasis on their immunologic functions. *Prog Allergy* 24, 245, 1977
- 54 Silberberg I, RL Baer, SA Rosenthal, GJ thorbecke, V Berezowsky. 1975. Dermal and intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity. *Cell Immunol.* 1975 Aug 18(2):435-53.
- 55 Braathen, LR. 1980. Studies on human epidermal Langerhans cells. III. Induction of T lymphocyte response to nickel sulphate in sensitized individuals. *Br.J DERMATOL*, 103,517,1980.

- 56 Sting G, E Wolff-Screiner, WJ Pichler, F Gschnait, W Knapp, K Wolff. 1977. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268, 245,1977.
- 57 Stingl G, SI Katz, L Clement L, I Green, EM Shavac. 1978. Immunological functions of Ia bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121,2005, 1978
- 58 Rowden G, MG Lewis, AK Sullivan. 1997. Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268, 347, 1977
- 59 Klareskog L, UM Malmnas-Tjerlund, U Forsum, PA Peterson. 1997. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268,248, 1977
- 60 Bradshaw M, M Wachstein, J Spence, JM Elias. 1963. Adenosine triphosphatase in melanocytes and epidermal cells of human skin. *J HistochemCytochem* 11,465,1963.
- 61 Holden CA, FA Kerdel, DM MacDonald. 1982. Lack of lysozyme alpha 1-antitripsine and alpha 1 antiquimotripsinein normal Langerhans cells: Differentiation from cells of the monocyte-histiocyte-macrophage series. *Acta Dermatovener* 62,513,1982.
- 62 Romani N, A Lenz, H Glass, H Stossel, U Stanzl, O Majdic, P Fritsch, G Schuller. 1989. Cultured human Langerhans cells resembled lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol*, 93, 600, 1989.
- 63 De Frassinette A, C Dezutter–Dambuyant, MJ Staquet, D Schmitt, J Thivolet. 1989. Epidermal Langerhans cells and cord blood monocyte-like CD1a positive cells express specific myelomonocytic membrane markers: CD14 and CD33. *J Invest Dermatol* 92, 429A, 1989.
- 64 Cocchia D, F Michetti, R Donato. 1981. Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*, 294,85,1981.
- 65 Schuler G., 1991. *Epidermal Langerhans Cells*. CRC Press, USA, 1991
- 66 Katz SI, K Tamaki, DH Sachs. 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells wich originate in the bone marrow. *Nature*, 282, 324,1979.
- 67 Frelinger JG, L Hood, S Hill, JA Frelinger. 1979. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature*, 282, 321,1979.
- 68 Chen HD, C Ma, JT Yuan, YK Wang, WK Silvers. 1986. Ocurrenco of donor Langerhans cells in mouse and rat chimeras and their replacement in skin grafts. *J Invest Dermatol*, 86, 630, 1986.
- 69 Roberts LK, GG Kreuger, RA Daynes. 1985. Correlation between the inducible keratinocyte expression of Ia and the movement of Langerhans cells in to the epidermis. *J Invest Dermatol* 134,3781,1985.
- 70 Shelley WB, L Juhlin. 1976. Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact allergens. *Nature*, 261, 46,1976.
- 71 Carr MM, E McVittie, K Guy, DJ Gawkrodger, JA Hunter. 1986. MHC class II antigen expression in normal human epidermis. *Immunology*, 59, 223, 1986.

- 72 Burke K, I Gigli. 1980. Receptors for complement on Langerhans cells. *J invest Dermatol*, 75, 46, 1980.
- 73 Olweus J, A BitMansour, R Warnke, PA Thmpson, J Carballido, LJ Picker, F Lund-Johansen. 1997. Dendritic cells ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc vNatl Acad Sci USA*, 94, 12551, 1997.
- 74 Peters JH, R Gieseler, B Thiele, F Steinbach. 1996. *Immunology today*, 17(6):273, 1996.
- 75 López M, L Amorim, P Gane, A Cristoph, D Bardinet, AM Abina, A Minty, J Bernard. 1997. IL-13 induces CD34+ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells., *Journal of Immunological Methods* 208 (1997) 117-129.
- 76 Steinman, R.M, 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu Rev Immunol*, 9,: 271-6.
- 77 Bell D., JW Young, J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv Immunol* 72:255-324.
- 78 Tyler J, D Curiel, T Curiel. 2002. Tumor immunotherapy: inching toward the finish line, *J. Clin. Invest.* 109:311–312 (2002).
- 79 Becker, Y. 1992. Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers--a review. *Anticancer Res.* 1992 Mar-Apr;12(2):511-20. Review.
- 80 Linder M, V Schirmmacher. 2002. Tumor cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethilen-glycol versus electro-fusion protocols. *European Journal of Clinical Investigation.* 32(3):207-217, 2002.
- 81 Butterfield LH, SM Jilani, NG Chakraborty, LA Bui, A Ribas, VB Dissette, R Lau, SC Gamradt, JA Glaspy, WH McBride, B Mukherji, JS Economou. 1998. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161(10):5607-13.
- 82 Okada H, H Tahara, MR Shurin, J Attanucci, KM Giezeman-Smits, WK Fellows, MT Lotze, WH Chambers, ME Bozik. 1998. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide elicit effective anti-tumor immunity against intracranial neoplasms. *Int J Cancer.* 1998 Oct 5;78(2):196-201.
- 83 Gabrilovich DI, IF Ciernik, DP Carbone. 1996. Simmons. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol.* 1996 May 25;170(1):101-10.
- 84 Almand B, JR Resser, B Lindman, S Nadaf, JI Clarck, ED Known, DP Carbone, DI Gabrilovich. 2000. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):1755-66.
- 85 Chaux P, M Moutet, J Faivre, F Martin, M Martin. 1996. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2

- costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest.* 1996 May;74(5):975-83.
- 86 Young MR, MA Wright, M Coogan, ME Young, J Bagash. 1992. Tumor-derived cytokines induce bone marrow suppressor cells that mediate immunosuppression through transforming growth factor beta. *Cancer Immunol Immunother.* 1992;35(1):14-8.
- 87 Pandit R, DM Lathers, NM Beal, T Garrity, MR Young. 2000. CD34+ immune suppressive cells in the peripheral blood of patients with head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000 Aug;109(8 Pt 1):749-54
- 88 Helstrom KE, HO Sjogren. 1966. Demonstration of common specific antigen(s) in mouse and hamster polyoma tumors. *Int J Cancer.* 1966 Sep 15;1(5):481-9.
- 89 Kripke ML. 1983. Immunological aspects of ultraviolet carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res.* 1983;132B:279-87.
- 90 Donawho C, ML Kripke. 1990. Immunogenicity and cross-reactivity of syngeneic murine melanomas. *Cancer Commun.* 1990;2(3):101-7
- 91 Donawho C, R Evans, ML Kripke. 1992. Immunobiology of primary murine melanomas. *J Immunother.* 1992 Oct;12(3):187-93.
- 92 van der Bruggen P, C Traversari, P Chomez, C Lurquin, E De Plaen, B van den Eynde, A Knuth, T Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.
- 93 Gaugler B, B van den Eyden, P van der Bruggen, JJ Gaforio, E De Plaen, B Lethe, F Brasseur, T Boon. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1994 Mar 1;179(3):921-30.
- 94 Oaks MK, JP Hanson, DP O'Malley. 1994. Molecular cytogenetic mapping of the human melanoma antigen (MAGE) gene family to chromosome region Xq27-qter: implications for MAGE immunotherapy. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1627-9.
- 95 Coulie PG, W Kartanikas, D Colau, C Lurquin, C Landry, M Marchand, T Dorval, V Brichard. 2001. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10290-5.
- 96 Brichard V, A Van PeI, T Wolfel, C Wolfel, E De Plaen, B Lethe, P Coulie, T Boon. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1993 Aug 1;178(2):489-95.
- 97 De Plaen E, C Lurquin, B Lethe, P van der Bruggen, V Brichard, JC Renauld. 1997. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods.* 1997 Jun;12(2):125-42. Review.

- 98 Coulie PG, V Brichard, A van Pel, T Wolfel, J Schneider, C Traversari, S Mattei, E De Plaen, C Lurquin, JP Szikora. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):35-42.
- 99 Butterfield LH, TC Stoll, R Lau, JS Economou. 1997. Cloning and analysis of MART-1/Melan-A human melanoma antigen promoter regions. *Gene.* 1997 Jun 3;191(2):129-34
- 100 Bell D, P Chomarat, D Broyles, G Netto, GM Harb, S Lebecque, J Valladeau, J Davoust, KA Palucka, J Banchereau. 1999. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med.* 1999 Nov 15;190(10):1417-26.
- 101 Wei N, SR Tahan. 1998. S100+ cell response to squamous cell carcinoma of the lip: inverse correlation with metastasis. *J Cutan Pathol.* 1998 Oct;25(9):463-8.
- 102 Lathers DM, E Lubbers, NM Beal, MA Wright, MR Young. 1999. Cultures derived from peripheral blood CD34+ progenitor cells of head and neck cancer patients and from cord blood are functionally different. *Hum Immunol.* 1999 Dec;60(12):1207-15.
- 103 Young MR, DM Lathers. 1999. Myeloid progenitor cells mediate immune suppression in patients with head and neck cancers. *Int J Immunopharmacol.* 1999 Apr;21(4):241-52. Review.
- 104 Si L, H Si, Y Chen, Y Sun, Y Wing. 1999. B7-1 antigen expression in tumor cells from cancerous human tissues. *Anal Quant Cytol Histol.* 1999 Dec;21(6):521-6.
- 105 Chaux P, B Lethe B, J van Snick, J Corthals, ES Schultz, CL Cambiaso, T Boon, P van der Bruggen. 2001. A MAGE-1 peptide recognized on HLA-DR15 by CD4(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2001 Jun;31(6):1910-6.
- 106 Yamakawa, M. 1995. Immunohistochemical analysis of dendritic Langerhans cells in thyroid carcinomas. *Anal Cell Pathol* 8:331-43 1995.
- 107 Cohen PJ, PA Cohen, SA Rosenberg, SI Katz, JJ Mule. 1994. Murine epidermal Langerhans cells and splenic dendritic cells present tumor-associated antigens to primed T-cells, *Eur J Immunol*, 24:315, 1994.
- 108 Heufler CL. 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells *J. Exp. Med.*, 167:700, 1988.
- 109 Koch F, CL Heufler, E Kämpgen, D Schneewiss, G Böck, G Schuler. 1990. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation *J. Exp. Med.*, 1990, 171:159,
- 110 Halliday GM. 1995. Spontaneous regression of human melanoma/non-melanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T-cells *World Journal of Surgery* 1995, 19,

- 111 Halliday GM. 1996. Tumour promoters but not initiators deplete Langerhans cells from murine epidermis *Photochem Photobiol*, 64:969-74, 1996.
- 112 Dandie GW. 1995. Effects of ultraviolet light on ovine Langerhans cells, in *Proceedings to the Fourth International Workshop on Langerhans Cells*. Sheveningen, 1995,81.
- 113 Noonan FP. 1988. cis-Urocanic acid, a product formed by ultraviolet B irradiation, initiates an antigen presentation defect in splenic dendritic cells in vivo *J. Invest. Dermatol.*, 1988, 90: 92
- 114 Peshwa MV. 1998. Induction of tumor-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in vitro using antigen-presenting cells pulsed with prostatic acid phosphatase peptide. *Prostate*, 1998,36(2):129-38.
- 115 Salgaller ML, BA Tjoa, PA Lodge, H Radge, G Kenny, A Boynton, GP Murphy. 1998. *Crit Rev Immunol*, 1998,18(1-2): 109-119.
- 116 Fanger NA, CR Maliszewski, K Schooley, TS Griffith. 1999. *J Exp Med*, 190(8): 1155-64, 1999.
- 117 Luger TA, MB Szein, JA Schmidt, P Murphy, G Grabner, JJ Oppenheim. 1983. Properties of murine and human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor. *Fed Proc III* 1983,42:2772-2776
- 118 Seiffert M, C Cant. 1999. *Blood*, 1999, 94(11)3633-43
- 119 Castell AR. 2001. Cuantificación de Células de Langerhans en Queratosis Actínica y Carcinoma Epidermoide. XI Congreso Nacional Español de Histología. La Rabida, España del 11 al 14 de septiembre de 2001.
- 120 John P, BA McArdle, A Knight. 1986. Quantitative assesment of Langerhans cells in actinic keratosis, Bowen's disease, keratoacanthoma, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Pathology* 1986; 18: 212-216.
- 121 Schuller G. 1991. *Epidermal Langerhans Cells*. CRC Press, USA1991.
- 122 Peña-Cruz V, I Susumu, O Mohamed, Y Kozo, C Christopher, Dascher, F von Lichtenberg, S Masahiko. 2001. Extraction of human Langerhans cells: a method for isolation of epidermis-resident dendritic cells *Journal of Immunological Methods*. 225 (2001):83-91
- 123 Berard F, P Blanco, J Davoust, EM Neidhart-Berard, M Nouri-Shirazi, N Taquet, D Rimoldi, JC Cerottini, J Banchereau, AK Palucka. 2000. Cross-Priming of Naive CD8 T Cells against Melanoma Antigens Using Dendritic Cells Loaded with Killed Allogeneic Melanoma Cells. *J. Exp. Med.* 192, (11),1535–1543.
- 124 McLellan AD, A Heiser D Hart. 1999. Induction of dendritic cell costimulatory molecule expression is suppressed by T cells in the absence of antigen-specific signalling: role of cluster formation, CD40 and HLA-class II for dendritic cell activation *Immunology* 1999 98 171–180

- 125 Yi O, R Desikan, B Barlogie, N Munshi. 2002. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 2002, 117, 297-305
- 126 Ni HT, SR Spellman, WC Jean, WA Hall, WC Low. 2001. Immunization with dendritic cells pulsed with tumor extract increases survival of mice bearing intracranial gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 51: 1-9, 2001.
- 127 Dhodapkar MV, RM Steinman, D Hema, C Fossella, J Krasovsky, SM Donahoe, PR Dunbar, V Cerundolo, DF Nixon, N Bhardwaj. 1999. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 1999, 104:173-180.
- 128 Dhodapark MV, N Bhardwaj. 2000. Active Immunization of Humans with Dendritic Cells *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 20, No. 3, 2000
- 129 Schott M, J Feldkamp, M Lettmann, D Simon, WA Scherbaum, J Seissler. 2001. Dendritic cell immunotherapy in a neuroendocrine pancreas carcinoma Case Report. *Clinical Endocrinology* 2001, 55, 271-277.

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA, APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DIA 13 DE OCTUBRE DE 2004.

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
Presidente

M. en B. E. Eduardo Casas Hernández
Secretario

Dr. Fernando García Tamayo
Vocal

Dr. Enrique Agustín Sampedro Carrillo
Vocal