

Melanoma e inmunidad

Melanoma and immunity

► María Marcela Barrio

* Dra. en Biología. Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA
Instituto Alexander Fleming

Resumen

La teoría de la inmunovigilancia postula que el sistema inmune es capaz de detectar células cancerosas reconociendo sus características particulares y eliminarlas previniendo la progresión del cáncer. Sin embargo, dicho proceso no es absolutamente eficaz, identificándose tres etapas propuestas para explicar la aparición de los tumores: en la primera (*Eliminación*) el sistema inmune es capaz de destruir células neoplásicas básicamente mediante efectores de la inmunidad innata; en la fase de *Equilibrio*, se inducen efectores específicos que reconocen y destruyen al tumor pero también se genera una presión de selección sobre las células tumorales generando variantes neoplásicas mutadas. Por último, en la etapa de *Escape*, las variantes del tumor que sobreviven se vuelven resistentes al reconocimiento y/o eliminación por los efectores inmunes y el tumor crece. En este artículo se presentan los principales antígenos (Ags) asociados al melanoma, las diversas estrategias terapéuticas que utilizan a estos Ags como blanco para inducir inmunidad, así como la existencia de los mecanismos de escape tumoral en el melanoma. Se analizan las evidencias más recientes acerca de cómo el microambiente tumoral condiciona la efectividad de la inmunidad celular específica evidenciando la necesidad actual de explorar terapias que combinen la acción de efectores de la inmunidad innata y la específica antitumoral, a la vez que modulen el microambiente tumoral para favorecer su acción.

Palabras clave: melanoma * teoría de la inmunovigilancia * inmunidad anti-melanoma * estrategias de inmunoterapia anti-melanoma

Summary

The immunosurveillance theory states that the immune system is capable of detecting cancer cells recognizing their particular characteristics and of eliminating them to prevent cancer progression. However, such process is not completely effective. Three stages proposed to explain the emergence of tumors can be identified in the process: in the first stage (Elimination) the immune system is capable of destroying neoplastic cells basically by means of innate immunity effectors; in the second (Equilibrium) stage, specific effectors that recognize and destroy the tumor are induced, but on the other hand, selection pressure is generated on tumor cells, originating mutated neoplastic variants. Finally, in the Escape stage, the tumor variants that survive become more resistant to identification and /or elimination by the immune effectors and consequently the tumor grows. The main melanoma-associated Ags, the various therapeutical strategies using these Ags as targets to induce immunity, as well as the existence of tumor escape mechanisms in the melanoma will be introduced in this chapter. Furthermore, the latest evidence on how tumor microenvironment determines the effectiveness of specific cell immunity will be analyzed, proving the present need of exploring therapies that both combine the action of innate immunity effectors and the anti-tumor specific effectors, and modulate the tumor microenvironment to favour its actions.

Keywords: melanoma * immunosurveillance hypothesis * anti-melanoma immunity * strategies of anti-melanoma immunotherapy

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Acta Bioquím Clín Latinoam 2009; 43 (3): 351-5

Antígenos asociados a melanoma e inmunidad anti-melanoma

La identificación de antígenos (Ags) tumorales específicos reconocidos por células T y anticuerpos en las últimas décadas ha establecido claramente que el sistema inmune puede naturalmente reconocer las células cancerosas pero, sin embargo, no puede controlar el crecimiento de los tumores. Si bien existen numerosos ejemplos en los cuales células T CD8+ aisladas de pacientes pueden reconocer a dichos Ags *in vitro* y eliminar células tumorales que los expresan, la falta de eficacia del sistema inmune para eliminar los tumores *in vivo* sugiere que, o bien existe una inmunodeficiencia generalizada en los pacientes con cáncer, o que el tumor ejerce alguna modulación sobre los efectores inmunes en el microambiente tumoral.

El melanoma es un tumor que se considera inmunogénico pero que evade exitosamente al sistema inmune diseminándose principalmente por la vía linfática y con gran capacidad de metástasis. Los principales Ags asociados al melanoma, expresados en la superficie celular asociados a HLA, están involucrados con la regulación de la proliferación celular, diferenciación, control de la pigmentación y calidad de la melanina (1). Los Ags de diferenciación melanocítica son proteínas normales que se expresan exclusivamente en melanomas y melanocitos normales y se relacionan con la formación del pigmento melanina (2). La gp100 es una proteína expresada en la membrana del melanosoma cuya expresión se correlaciona con el contenido celular de melanina y es frecuentemente reconocida por linfocitos T citotóxicos (CTLs) (3). En general, los CTLs reconocen un nonapéptido compuesto por dos segmentos no contiguos de gp100, generado a partir de un péptido precursor de 13 aa en el contexto de HLA-A0201 (4). Melan A/MART-1 es una proteína transmembrana, sin sitios de N-glicosilación, altamente enriquecida en los melanosomas tempranos. Se expresa en la piel, la retina y la mayoría de los melanocitos y melanomas en cultivo, mientras que está ausente en otros tejidos y tumores Melan A/MART-1 fue aislada independientemente por dos grupos de investigadores a partir de clones de linfocitos T reactivos que reconocen péptidos derivados de Melan A/MART-1 en el contexto HLA-A0201 (5) (6). Se ha demostrado que Melan A/MART-1 es indispensable para la función de gp100, jugando así un rol esencial en la regulación de la pigmentación (7). También se encontró entre los Ags de diferenciación melanocítica a las proteínas tirosinasa, DOPAcrómico tautómera y Trp 1 y 2 (8) involucradas principalmente en la formación de melanina a partir de la tirosina.

Otro grupo lo constituyen los llamados Ags onco-fetales, cuya expresión generalmente está restringida a células tumorales o células de la línea germinal (testículo y placenta). Dentro de los Ags onco-fetales están las proteínas llamadas MAGE (subgrupo I) (9-12), BAGE (Ags de Melanoma B) (13) y GAGE (Ags de Melanoma G) (14). Varios miembros de la familia MAGE juegan un importante rol fisiológico y patológico durante la embriogénesis a través de un mecanismo de activación y desactivación de genes por metilación. En el caso de la formación de un tumor, esos genes podrían ser reactivados y las proteínas resultantes reconocidas y atacadas por el sistema inmune. De aquí se desprende que las proteínas MAGE poseen un rol importante en la vigilancia inmunitaria de ciertos tipos de tumores (12). El

Ag NY-ESO-1 (15) fue aislado a partir de una biopsia de un carcinoma de células escamosas de esófago y es uno de los Ags onco-fetales más inmunogénicos. NY-ESO-1 está expresado en 20-40% de los melanomas, y en alrededor del 50% de los pacientes con tumores avanzados (que expresan NY-ESO-1) es posible detectar anticuerpos y linfocitos T CD8+ espontáneos específicos (16).

Mientras que la protección humoral con anticuerpos podría neutralizar las células tumorales que alcancen el torrente sanguíneo, la destrucción de nidos micro-metastáticos sólo podría lograrse mediante una adecuada penetración de CTLs, o células *natural killer* (NK) al sitio tumoral (17-19). Múltiples estudios en modelos animales demostraron que la respuesta inmune, tanto celular como humoral, puede lograr el rechazo de tumores transplantados. Con la excepción de anticuerpos dirigidos a los receptores de factores de crecimiento en las células tumorales, la administración de anticuerpos ha tenido bajo impacto sobre el crecimiento de los tumores sólidos.

El melanoma cutáneo primario es capaz de despertar una respuesta inmune, como se infiere por la intensa reacción linfoide que suele acompañar dichas lesiones. En contraposición, dicha capacidad se pierde en gran medida en las metástasis. Resultados previos observados por nuestro grupo en biopsias de metástasis obtenidas de más de 50 pacientes con melanoma cutáneo han demostrado que la infiltración linfoide intratumoral es relativamente escasa (Dr. Mordoh, comunicación personal). Existen evidencias que un paciente con melanoma puede desarrollar respuesta inmune para múltiples Ags asociados a melanoma, como se observa por la reactividad de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Por ejemplo, es posible identificar en un mismo paciente con melanoma TILs reactivos con tirosinasa, b-catenina, gp100, TRP-1, TRP-2 y Ki-67 así como en otros casos se aislaron TILs reactivos con TRP-1, TRP-2 y NY-ESO-1 (20).

Toda esta variedad de Ags asociados a melanoma ha sido intensamente explotada para la elaboración de distintas estrategias de vacunación en pacientes con enfermedad declarada, buscando lograr en el período libre de enfermedad una inmunización eficaz del paciente induciendo una respuesta humoral y celular específica en suficiente magnitud como para neutralizar el crecimiento y diseminación de las células de melanoma que ya pudieran haber metastatizado. También linfocitos reactivos contra los Ags asociados a melanoma han sido utilizados para terapia adoptiva. En estos casos, linfocitos Ag-específicos son inyectados en grandes números luego de la expansión *ex vivo*, ya sea a partir de TILs o generados a partir de linfocitos de sangre periférica transducidos con receptores de células T (TCR), en combinación con IL-2 (21) (22).

Escape tumoral e inmunosupresión local

El éxito de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer está afectado por la heterogeneidad existente entre células tumorales, la inmunogenicidad de los Ags tumorales y los mecanismos de escape que los tumores desarrollan para evadir la respuesta inmunológica. El hecho que el melanoma se desarrolle en individuos inmunocompetentes y que coexista el tumor en progresión con los efectores inmunes específicos, incluso en grandes números, como sucede tras la administración de TILs, constituye una paradoja de la inmunología tumoral.

Que el melanoma se desarrolle en la piel, barrera inmune primaria contra los patógenos y se disemine por la vía linfática también resulta paradójico, ya que la posibilidad de encuentro con el sistema inmune es inevitable. Existen varias teorías para tratar de explicar esta paradoja, sustentadas por evidencia acumulada en las últimas décadas.

La teoría de la inmunovigilancia propone que constantemente se están generando células tumorales en cierto número, siendo la mayoría de ellas eliminadas por el reconocimiento específico del sistema inmune (etapa de eliminación). Sin embargo, cuando se forman los tumores el proceso falla ya que el tumor en formación comienza a crecer e invadir los tejidos adyacentes, conforme se van seleccionando variantes tumorales que no pueden ser eliminadas completamente. En esta fase, el tumor sólido adquiere cierto tamaño y va induciendo señales de inflamación que dan lugar al reclutamiento de células del sistema inmune innato y células dendríticas (CDs). Las células transformadas son reconocidas y eliminadas por linfocitos infiltrantes tales como NK, NKT, macrófagos y linfocitos T (23). El IFN- γ produce muerte de células tumorales al inducir mecanismos apoptóticos y antiproliferativos y la producción de quemoquinas con capacidad angiostática bloqueando la formación de nuevos vasos. Los restos celulares formados son ingeridos por las CDs locales que migran a los ganglios linfáticos drenantes, inducen células T CD4+ específicas secretantes de IFN- γ que facilitan el desarrollo de células T CD8+. Estos eliminan a las células tumorales principalmente mediante perforinas y granzimas (23). En esta etapa los CTLs destruyen las células remanentes que expresan Ags tumorales pero también se inicia un proceso de *inmunoección* donde el sistema inmune del paciente y las células tumorales entran en equilibrio. En esta etapa los linfocitos y el IFN- γ ejercen una presión de selección sobre las células tumorales. Esta presión es suficiente para contenerlas pero no para extinguirlas. Las células tumorales son genéticamente inestables y mutan rápidamente. Durante este período muchas células mutantes son destruidas pero algunas de ellas se hacen resistentes al ataque inmune. Esta fase del proceso es la más larga y puede conllevar un período de muchos años (23). La adquisición de múltiples mecanismos contribuye a la fase de Escape donde existen variantes del tumor que sobreviven y se hacen resistentes a la detección o eliminación inmunológica a través de los cambios genéticos y epigenéticos, comenzando a expandirse de manera descontrolada. Una de las causas del escape tumoral podría ser que las células tumorales, y en particular algunos melanomas, crecen con mayor rapidez que el tiempo que requiere el sistema inmune para activar sus mecanismos. Por otra parte, se han descrito diversos factores que permitirían al melanoma la evasión de los sistemas inmunológicos de defensa. Las células tumorales pueden producir diferentes factores solubles capaces de inhibir la respuesta inmune. La eliminación de células T que responden a Ags propios a través de la unión del ligando de Fas (FasL) al receptor Fas (CD95) es un mecanismo bien conocido para la inducción de apoptosis de linfocitos autoreactivos (24) (25). Las células de melanoma expresan altos niveles de FasL que podrían inducir apoptosis en células T infiltrantes o circulantes. Además, las células tumorales pueden perder la expresión de Fas, desarrollando resistencia a la apoptosis inducida por FasL, expresado en células efectoras del sistema inmune. En un trabajo de este laboratorio Morvillo y colaboradores (26) de-

mostraron que la línea celular de melanoma IIB-MEL-J secretaba una proteína de 14 kDa capaz de suprimir la respuesta antitumoral del sistema inmune que posteriormente fue identificada como galectina-1 (Gal-1) (27). Las galectinas son una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución, con afinidad por azúcares β -galactósidos, que se unen a glicoconjugados en la superficie celular y en la matriz extracelular y son capaces de gatillar señales de muerte, proliferación y diferenciación. Se ha demostrado que Gal-1 es un potente factor inmunosupresor, ya que inhibiendo su producción endógena en células de melanoma B16, las mismas son rápidamente rechazadas *in vivo* (27). Este grupo de investigación demostró analizando biopsias de melanomas humanos una correlación entre la expresión de galectina-3 (Gal-3) y apoptosis linfocitaria local. Gal-1 y Gal-3 serían moléculas expresadas por las células tumorales para contrarrestar la función efectora antitumoral del sistema inmune (28). Recientemente se ha demostrado que además Gal-1 producida por células de melanoma es capaz de disparar un circuito de señales en CDs que resulta en una función tolerogénica de las mismas, mediada por IL-27 e IL-10, impidiendo el desarrollo de una respuesta inmune protectora en el modelo de melanoma murino B16. Los autores demostraron que CDs diferenciadas en un microambiente rico en Gal-1 no son capaces de despertar una respuesta de células T efectiva contra un desafío tumoral y en cambio, conducen a un balance de citoquinas con perfil tolerante en los sitios de crecimiento tumoral (29).

Dado que el reconocimiento de Ags se basa fundamentalmente en la presentación antigénica, la pérdida de HLA I en la superficie de las células tumorales produce una presentación antigénica deficiente que resulta en el escape de la destrucción por CTLs. Las alteraciones en HLA I pueden ser la pérdida total o la baja expresión de uno o varios de los alelos HLA I, la expresión de variantes alélicas mutadas, alelos HLA inmunosupresores o bien la falta de respuesta a las señales de activación, como por ejemplo la producción de interferones de tipo I (30-34). Las alteraciones en HLA I llevan a un cargado de péptidos inmunogénicos inadecuado o disminuido y por lo tanto resulta en una presentación ineficiente en la superficie de las células tumorales. Sumado a este hecho, la propia heterogeneidad antigénica dentro del tumor puede impedir la generación de una respuesta inmune antitumoral eficaz ya que las células que no expresan los Ags tumorales escapan del reconocimiento por los CTLs específicos.

Otra causa del escape tumoral podría deberse a la ignorancia de los Ags tumorales por el sistema inmune ya que los Ags tumorales pueden no ser presentados al sistema inmune principalmente por la falta de señales de coestimulación (segunda señal) que resulta en la inducción de anergia en los linfocitos específicos y tolerancia inmunológica. Este fenómeno puede darse, por ejemplo, por la expresión en las células de melanoma de moléculas HLA clase II (generalmente restringidas al linaje de células presentadoras de Ags) y la ausencia de moléculas B7; esto lleva a interferir con la función *helper* de los linfocitos T CD4+ y resulta en la falta de respuesta inmune (35).

Varios factores expresados directamente en la membrana de las células tumorales pueden inhibir la función de las células T. Entre ellos, PD-L1/ B7-H1 actúa sobre las células T regulando su activación y diferenciación tras la unión a PD-1 (CD28), expresado en linfocitos T. PD-1/B7-H1 co-estimula la producción de IL-10 en las células T no activadas (*res-*

ting) e induce apoptosis de las células T activadas (36). Se ha demostrado que PD-1/B7-H1 media la inhibición de la respuesta activada de los linfocitos T, probablemente inhibiendo la progresión del ciclo celular. La expresión de la proteína PD-L1/B7-H1 se limita al linaje del macrófago y se cree es uno de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la tolerancia a auto-antígenos. Las células de melanoma pueden expresar PD-L1/B7-H1 y por consiguiente inducir la apoptosis de células T específicas contra los Ags tumorales (36).

Existen fuertes evidencias que muestran que el melanoma genera un perfil de citoquinas que ejercen una potente acción inmuno-inhibitoria a nivel local. Así, la generación de un microambiente localmente inmunosupresor representa un paso crítico en la progresión del melanoma. Entre las citoquinas inmunosupresoras secretadas por el melanoma están TGF- β , IL-6, IL-8, IL-10 y la enzima inmunosupresora IDO (37-40). Es decir, que el melanoma no sólo evita el reconocimiento por el sistema inmune sino que además altera activamente las funciones del sistema inmune a nivel local. Dicha inmunosupresión incluye la presencia de linfocitos T regulatorios (41) y la modulación de las CDs del microambiente tumoral, influyendo en su maduración y otorgándoles un perfil tolerogénico. De hecho, se ha descrito en el tejido tumoral de ganglios linfáticos con metástasis de melanoma, la presencia de CDs inmaduras que expresan HLA-DR pero no las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y bajos niveles de CD86. Además, dichas CDs purificadas de las metástasis no producen niveles significativos de IL-12, IL-15 o IL-18 tras la estimulación *in vitro* con Poli (I:C), LPS o GM-CSF (adyuvantes inmunes) (42). En cambio, cocultivos de células de melanoma y células inmunes de los ganglios metastásicos producen altas concentraciones de IL-10 en respuesta a Poli (I:C). Estas observaciones sugieren que las CDs en el microambiente inmunosupresor tras la estimulación con señales pro-inflamatorias no generan una potente respuesta inmune de células T sino que *down*-regulan la actividad de los linfocitos T. En los pacientes con melanoma esta inmunosupresión local podría influir negativamente la acción antitumoral de linfocitos generados a nivel sistémico por estrategias de vacunación o inyectados por transferencia adoptiva de células T. Más recientemente, se ha reportado que el microambiente inmunosupresor también es generado por el tumor primario en los ganglios centinelas tanto positivos como negativos (sin metástasis), sugiriendo la hipótesis de que CDs tolerizadas en el tumor primario migran a los ganglios centinelas, donde secretan IDO y TGF- β 1 creando un microambiente inmunoprivilegiado que pre-condiciona los ganglios para la subsecuente diseminación del melanoma (43-45).

Dadas las evidencias actuales para lograr una inmunoterapia eficaz para el melanoma será necesario lograr una potente inmunización combinada con la reversión de la inmunosupresión en el microambiente tumoral, para lo cual es necesario continuar investigando para conocer mejor los mecanismos de inmunosupresión generados por los tumores e identificar nuevos blancos de intervención terapéutica.

CORRESPONDENCIA

DRA. MARCELA MARÍA BARRIO
Centro de Investigaciones Oncológicas
Fundación Cáncer
Zabala 2836, 1426 Capital Federal
E-mail: barrio.marcela@gmail.com

Referencias bibliográficas

- Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 2000; 182, 3, 323-31.
- Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003; 22 (20): 3063-9.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, *et al.* Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 3515-9.
- Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, *et al.* An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 2004; 304 (5670): 587-90.
- Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, *et al.* A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994; 180: 35-42.
- Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Chen YT, Stockert E, *et al.* Expression of melanocyte associated markers gp-100 and Melan-A/MART-1 in angiomyolipomas. *Virchows Arch* 1999; 434: 429-35.
- Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 2005; 280 (14): 14006-16.
- Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Wölfel C, De Plaen E, Lethé B, *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993; 178: 489-95.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
- Chen YT, Stockert E, Chen Y, Garin-Chesa P, Rettig WJ, van der Bruggen P, *et al.* Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1004-8.
- Chen YT, Gure AO, Tsang S, Stockert E, Jager E, Knuth A, *et al.* Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6919-23.
- Jiang Xiao, Hong-Song Chen. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (13): 1849-53.
- Segal NH, Blachere NE, Guevara-Patiño JA, Gallardo HF, Shiu HY, Viale A, *et al.* Identification of cancer-testis genes expressed by melanoma and soft tissue sarcoma using bioinformatics. *Cancer Immunol* 2005; 5: 2.
- Bazhin AV, Wiedemann N, Schnölzer M, Schadendorf D, Eichmüller SB. Expression of GAGE family proteins in malignant melanoma. *Cancer Lett* 2007; 251 (2): 258-67.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (5): 1914-8.
- Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, *et al.* A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 1998; 187 (8): 1349-54.
- Klein E, Mantovani A. Action of natural killer cells and macrophages in cancer. *Curr Opin Immunology* 1993; 5: 714-8.
- Peña J, Solana R. MHC antigens in NK recognition and lysis. *Immunol Res* 1992; 11: 130-40.

19. Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002; 29: 5-10.
20. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411:17.
21. Krönig H, Hofer K, Conrad H, Guillaume P, Müller J, Schiemann M, *et al.* Allorestricted T lymphocytes with a high avidity T-cell receptor towards NY-ESO-1 have potent anti-tumor activity. *Int J Cancer* 2009; 125 (3): 649-55.
22. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, *et al.* Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86 (15): 1159-66.
23. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3 (11): 991-8.
24. Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol* 2002; 12 (1): 43-50.
25. Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53 (10): 904-10.
26. Morvillo V, Bover L, Mordoh J. Identification and characterization of a 14 kDa immunosuppressive protein derived from IIB-MEL-J, a human melanoma cell line. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1996; 42 (5): 779-95.
27. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection. A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004; 5 (3): 241-51.
28. Zubieta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol* 2006; 168 (5): 1666-75.
29. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009; 10 (9): 981-91.
30. Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho FM, *et al.* Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics* 2008; 60 (8): 439-47.
31. Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, Jiménez P, Aptsiauri N, Garrido F, *et al.* Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 2007; 7: 34.
32. Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin Cancer Biol* 2007; 17 (6): 422-9.
33. Adrián Cabestré F, Moreau P, Riteau B, Ibrahim EC, Le Danff C, Dausset J, *et al.* HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol* 1999; 43 (2): 183-93.
34. Denfeld RW, Dietrich A, Wuttig C, Tanczos E, Weiss JM, Vanscheidt W, *et al.* In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Int J Cancer* 1995; 62 (3): 259-65.
35. Becker JC, Bröcker EB. Lymphocyte-melanoma interaction: role of surface molecules. *Recent Results. Cancer Res* 1995; 139: 205-14.
36. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8 (8): 793-800.
37. Real LM, Jimenez P, Kirkin A, Serrano A, Garcia A, Canton J, *et al.* Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 49: 621-8.
38. Lee JH, Torisu-Itakara H, Cochran AJ, Kadison A, Huynh Y, Morton DL, *et al.* Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 107-12.
39. Chen PW, Mellon JK, Mayhew E, Wang S, He YG, Hogan N, *et al.* Uveal melanoma expression of indoleamine 2,3-deoxygenase: Establishment of an immune privileged environment by tryptophan depletion. *Exp Eye Res* 2007; 85: 617-25.
40. Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewski TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8 T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1185-97.
41. Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57 (12): 1795-805.
42. Polak ME, Johnson P, Di Palma S, Higgins B, Hurren J, Borthwick NJ, *et al.* Presence and maturity of dendritic cells in melanoma lymph node metastases. *J Pathol* 2005; 207: 83-90.
43. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, *et al.* Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2007; 96: 1879-87.
44. Vuylsteke RJ, Molenkamp BG, van Leeuwen PA, Meijer S, Wijnands PG, Haanen JB, *et al.* Tumor-specific CD8 T cell reactivity in the sentinel lymph node of GM-CSF-treated stage I melanoma patients is associated with high myeloid dendritic cell content. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2826-33.
45. Botella-Estrada R, Dasi F, Ramos D, Nagore E, Herrero MJ, Gimenez J, *et al.* Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. *Melanoma Res* 2005; 15: 99-106.

Aceptado para su publicación el 25 de septiembre de 2009