

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Histología y Anatomía Patológica

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN PATOBIOLÓGICA DEL
MELANOMA UVEAL**

MARÍA MATILLA RODERO

Málaga, 2003

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

Prof. Dr. D. José Manuel García Campos, Catedrático de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que Dña. María Matilla Rodero ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral, titulado "**CARACTERIZACIÓN PATOBIOLÓGICA DEL MELANOMA UVEAL**", que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla



Dr. José Manuel García Campos

UNIVERSIDAD DE MALAGA REGISTRO GENERAL
Entrada
Nº. 200300100008151
30/06/2003 11:19:11

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de la Tesis, los profesores Dr. Alfredo Matilla Vicente y Dr. José Manuel García Campos, Catedráticos de Anatomía Patológica y Oftalmología, respectivamente, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. Martina Álvarez, por la inestimable ayuda que ha representado para mí en la elaboración de este trabajo.

A los responsables de Servicios de Anatomía Patológica que me han proporcionado los casos de estudio: Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga (Prof. Alfredo Matilla), Hospital Universitario “Carlos Haya” de Málaga (Dr. Sebastián Luna), Hospital U. Regional “Virgen Macarena” de Sevilla (Prof. Hugo Galera) y Hospital General “Torrecárdenas” de Almería (Dr. Joaquín Américo).

A la Dra. Inmaculada Ramírez, por su importante colaboración en la confección del manuscrito.

A Dña. M^a José Lozano, por su disponibilidad y esmero al efectuar las técnicas histopatológicas que se requirieron.

A Dña. Sara Gil por sus diversas gestiones y ayuda en las tareas finales para la elaboración de este trabajo.

A mis padres, por su generosidad incondicional y por haber representado un ejemplo a seguir en todos los aspectos importantes de la vida.

A José María, por estar siempre a mi lado, ayudándome en todo momento y animándome siempre con la palabra oportuna.

A José María

A María

A mis padres

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL TRACTO UVEAL.....	02
1.1 Iris	02
<i>Anatomía</i>	
<i>Histología</i>	
1.2 Cuerpo ciliar	04
<i>Anatomía</i>	
<i>Histología</i>	
1.3 Coroides	05
<i>Anatomía</i>	
<i>Histología</i>	
2. TUMORES MELANOCÍTICOS DEL TRACTO UVEAL.....	06
2.1 Melanocitos uveales	06
<i>Definición</i>	
<i>Origen embriológico</i>	
2.2 Lesiones melanocíticas de la uvea	07
<i>Peca</i>	
<i>Nevus</i>	
<i>Melanocitosis ocular</i>	
<i>Melanoma primario</i>	
2.3 Clasificación cito-histopatológica	09
<i>Nevus</i>	
<i>Melanoma</i>	
-Tipos celulares	
-Clasificación de Callender	
-Clasificación de Callender modificada	
3. MELANOMA UVEAL.....	15
3.1 Epidemiología	15
<i>Incidencia</i>	
<i>Mortalidad</i>	
3.2 Factores etiológicos	17
<i>Edad</i>	
<i>Sexo</i>	
<i>Pigmentación racial y color del iris</i>	
<i>Lesiones predisponentes</i>	
-Nevus azul	
-Melanocitosis ocular congénita	
<i>Factores genéticos y predisposición familiar</i>	
<i>Patología asociada/concurrente</i>	
- Síndrome del nevus displásico cutáneo	
- Neurofibromatosis	
- Xeroderma pimentosum	

<i>Situación hormonal</i>	
<i>Inmunocompetencia</i>	
<i>Factores ambientales</i>	
-Nivel socioeconómico	
- Factores geográficos	
- Radiación actínica solar y de otras fuentes	
- Exposiciones ocupaciones y químicas	
- Virus	
- Trauma	
- Aparición en parejas (“concubial”)	
3.3 Historia natural	26
<i>Lesiones precursoras</i>	
<i>Características del crecimiento</i>	
<i>Extensión local y metástasis</i>	
3.4 Características clínicas	30
<i>Melanoma del iris</i>	
-Circunscrito	
-Difuso	
<i>Melanoma del cuerpo ciliar</i>	
-Efectos secundarios en estructuras adyacentes	
<i>Melanoma de coroides</i>	
-Efectos secundarios en estructuras adyacentes	
3.5 Características cito-histopatológicas	38
<i>Hallazgos inmunohistoquímicos</i>	
-Marcadores de diferenciación	
-Marcadores de proliferación	
-Otros marcadores inmunohistoquímicos	
3.6 Diagnóstico	41
<i>Melanomas del iris</i>	
<i>Melanomas de la úvea posterior</i>	
-Historia clínica	
-Evaluación sistémica	
-Examen oftalmológico y estudios complementarios	
3.7 Tratamiento	55
<i>Melanomas del iris</i>	
<i>Melanomas de la úvea posterior</i>	
Generalidades: controversias respecto a la enucleación, factores que condicionan la elección terapéutica y selección del tratamiento	
Modalidades terapéuticas: observación periódica, fotocoagulación, radioterapia, resección local, enucleación, exenteración orbitaria, metástasis sistémicas, otras opciones y conclusiones	
Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS)	
4. PATOBIOLOGIA DEL CRECIMIENTO NEOPLÁSICO	80
4.1 Aspectos generales	80
<i>Fisiopatología de la proliferación celular</i>	
Proto-oncogenes/oncogenes	
Genes supresores	
Genes que regulan la apoptosis	
Genes reparadores del ADN	
<i>Factores promotores e inhibidores del crecimiento</i>	
Receptores de factores de crecimiento	
<i>Proteínas citoplásmicas que transducen la señal mitógena</i>	

	<i>Proto-oncogenes implicados en la transcripción génica</i>	
	<i>Genes supresores de tumores</i>	
	<i>Genes reparadores del ADN</i>	
	<i>El ciclo celular</i>	
	Regulación del ciclo celular	
	Adhesión celular	
	Envejecimiento celular	
	Necrosis celular y tisular	
	Apoptosis	
	4.2 Transformación y progresión neoplásica	99
5.	FACTORES PRONÓSTICOS EN EL MELANOMA UVEAL	105
	5.1 Clínicos	106
	<i>Localización del tumor</i>	
	<i>Tamaño del tumor</i>	
	<i>Configuración del tumor</i>	
	<i>Método de tratamiento</i>	
	5.2 Histopatológicos	110
	<i>Tipo celular</i>	
	<i>Actividad mitótica</i>	
	<i>Arquitectura de la microcirculación (patrones vasculares)</i>	
	<i>Infiltrado linfocitario</i>	
	<i>Extensión extraescleral</i>	
	5.3 Patobiológicos	113
	<i>Actividad celular proliferativa</i>	
	Regiones organizadoras nucleolares (AgNOR)	
	Expresión de inmunohistoquímica de Ki-67 y PCNA	
	Aneuploidía	
	<i>Antígenos de histocompatibilidad</i>	
	<i>Citogenética y genética molecular</i>	
II.	PLANTEAMIENTO DEL TEMA	119
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	120
	1. DATOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS	121
	2. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO CONVENCIONAL	121
	3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	133
	4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	138

IV. RESULTADOS	139
A. ESTUDIO DESCRIPTIVO GENERAL.....	140
1.1 Casos	140
1.2. Características clínicas y macroscópicas	140
<i>Sexo</i>	
<i>Edad</i>	
<i>Distribución de los casos por grupos de edad y sexo</i>	
<i>Localización del tumor</i>	
<i>Tamaño del tumor</i>	
<i>Distribución de los casos por localización y tamaño</i>	
1.3. Características histopatológicas	142
<i>Patrón histológico</i>	
<i>Necrosis</i>	
<i>Pigmentación melánica</i>	
<i>Pleomorfismo celular/nuclear</i>	
<i>Prominencia nucleolar</i>	
<i>Hendiduras nucleares longitudinales</i>	
<i>Mitosis</i>	
1.4. Estudio inmunohistoquímico	146
<i>Distribución de los casos según la expresión de bcl-2</i>	
<i>Distribución de los casos según la expresión de Ki-67</i>	
B. ESTADÍSTICA ANALÍTICA.....	148
2.1 Relación del patrón histológico con la presencia de pigmento melánico	
2.2 Relación del patrón histológico con el pleomorfismo celular/nuclear	
2.3 Relación del patrón histológico con la presencia de hendiduras nucleares longitudinales.	
2.4 Relación del patrón histológico con las mitosis	
2.5 Relación del patrón histológico y la prominencia nucleolar	
2.6 Relación del patrón histológico y la presencia de necrosis tumoral	
2.7 Relación de las mitosis y la fracción proliferativa determinada con Ki-67	
2.8 Relación del pleomorfismo celular/nuclear y la fracción proliferativa determinada con Ki-67	
2.9 Relación del pleomorfismo celular/nuclear y la inmunoexpresión de bcl-2	

- 2.10 Relación de la prominencia nucleolar y el índice de proliferación Ki-67
- 2.11. Relación de la prominencia nucleolar y la reactividad para bcl-2

V.	DISCUSIÓN	155
	1.ASPECTOS CLINICO PATOLÓGICOS.....	157
	2.ASPECTOS INMUNOHISTOQUIMICOS Y BIOMOLECULARES....	164
VI.	CONCLUSIONES	175
VII.	BIBLIOGRAFIA	178

ABREVIATURAS

AAM: anticuerpos monoclonales asociados al melanoma

AcMc(s): anticuerpos monoclonal(es)

ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico

AgNORs: regiones organizadoras nucleolares

AFIP: Instituto de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de Norteamérica

AFG: angiofluoresceingrafía (angiografía fluoresceínica)

AOs: anticonceptivos orales

AV: agudeza visual

ARN/RNA: ácido ribonucleico

BMC: biomicroscopía

CGA: campos microscópicos de gran aumento

COMS: Collaborative Ocular Melanoma Study

DD: diámetro de disco

DEP: desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina

DMAE: degeneración macular asociada a la edad

DR: desprendimiento de retina

EDC: ecografía doppler color

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

EPR: epitelio pigmentario de la retina

EULP: esclerouvectomía lamelar parcial

HLA: antígenos de leucocitos humanos

Kda: quilodalton

LH: lámpara de hendidura

LSR: líquido subretiniano

IHQ: técnica/estudio inmunohistoquímica/o

MCP: muerte celular programada

MMC: melanoma cutáneo

MSH: hormona melanocito-estimulante

MU: melanoma uveal

MUF: melanoma uveal familiar

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAAF: punción aspiración con aguja fina

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PERT: radioterapia externa preoperatoria

PIO: presión intraocular

RNM: resonancia nuclear magnética

ROP: Registro de patología oftálmica de la AFIP

SND: síndrome del nevus displásico (cutáneo)

ssCP: polimorfismo conformacional de cadena simple

TAC: tomografía computarizada abdominal

TGF: factor de crecimiento transformante

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VPP: vitrectomía pars plana

I. INTRODUCCIÓN

1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL TRACTO UVEAL

El tracto uveal es la capa vascular pigmentada del globo ocular formada por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. Está formada por numerosos vasos sanguíneos, un número variable de melanocitos, tejido conectivo de soporte y nervios.

1.1 El iris

Anatomía

El iris se localiza delante del cristalino y divide la parte anterior del ojo, que contiene el humor acuoso, en cámara anterior y posterior. El iris forma un diafragma, permitiendo a la luz entrar en el ojo solamente a través de la pupila. La cantidad de luz que pasa al interior del ojo es controlada por los cambios en el tamaño pupilar. La contracción del iris reduce la cantidad de luz e incrementa la profundidad de foco del ojo.

La superficie del iris está constituida por depresiones y crestas. Este aspecto trabeculado es creado por los vasos iridianos y bandas fibrosas en el estroma que siguen una dirección radial, desde la pupila hacia la base del iris. El círculo vascular menor del iris está formado por un anillo de vasos en el estroma del iris a nivel de la unión de los tercios interno y medio, dividiendo al iris en una zona estrecha pupilar y una amplia zona ciliar.

Las criptas son excavaciones de tamaño variable en la superficie anterior del iris. Pueden advertirse agregados de células pigmentadas en el estroma anterior del iris, formando el “moteado iridiano”. Cuando la pupila está dilatada pueden ser visualizados surcos concéntricos con la periferia del iris.

El color del iris viene determinado por el contenido de células pigmentadas del estroma. La mayoría de los iris son azules al nacimiento, cuando el tracto uveal todavía no está pigmentado. Entre los 3 y 6 meses de edad, el iris alcanza la pigmentación definitiva. Si el estroma iridiano carece de células pigmentadas (melanocitos) pero su doble capa de epitelio pigmentario está normalmente pigmentada, el iris aparece azul. Por el contrario, el iris en muchos individuos albinos es deficiente en melanina no sólo en las células del estroma, sino también en el

epitelio pigmentario. En estos individuos, el iris aparece rosado por el reflejo del fondo de ojo a través del iris amelanótico.

Histología

El iris está formado por cuatro capas: la limitante anterior, el estroma, el músculo dilatador y el epitelio posterior.

La capa limitante anterior es una condensación de células estromales y melanocitos. Varía considerablemente en grosor y pigmentación de un ojo a otro y en diferentes áreas dentro del mismo iris. Esta capa puede estar muy atenuada o incluso ausente, sobre todo sobre las criptas iridianas, donde no hay procesos celulares cubriendo el estroma subyacente.

El estroma iridiano contiene tejido conectivo con vasos sanguíneos, nervios, melanocitos y el músculo esfínter de la pupila. Las características tisulares del estroma permiten una rápida expansión y contracción. Los vasos sanguíneos, que son muy numerosos en el iris, discurren radialmente. Entran en la raíz del iris y pasan a través de la zona ciliar en varias capas. En la unión de la zona ciliar y pupilar, se anastomosan para formar el círculo menor del iris, constituido por venas y arterias. Los vasos iridianos tienen típicamente una pared gruesa, con una capa de endotelio sobre una base de fibras de colágeno. Las fibras nerviosas son sensitivas, vasomotoras y motoras. En el estroma iridiano se aprecian algunas células agrupadas. Estudios con microscopía electrónica muestran dos tipos de grupos celulares: tipo I, que son macrófagos con melanina fagocitada, y tipo II, que son células neuroepiteliales con gránulos citoplásmicos de melanina y, probablemente, células del epitelio pigmentario que han emigrado al estroma en la zona del esfínter.

El músculo esfínter del iris es músculo liso localizado en el estroma posterior del iris próximo a la pupila. Sus anclajes a las fibras de colágeno del estroma permiten que funcione incluso tras quitar un segmento de la porción pupilar del iris. El músculo dilatador del iris se continua con la capa anterior del epitelio pigmentario del iris y se extiende desde la región del esfínter hasta la base del iris. Los músculos dilatador y esfínter de la pupila derivan de la capa externa de la vesícula óptica y son de tipo neuroectodérmico.

El epitelio del iris está formado por dos capas de células muy pigmentadas, que se distinguen como capas separadas con microscopía electrónica. Esta doble capa

de epitelio pigmentario cubre la superficie posterior del iris y resulta de la unión de las dos capas epiteliales, formando el extremo anterior de la vesícula óptica embrionaria. La capa anterior del epitelio iridano está altamente especializada. En sus ápices, estas células pigmentadas son cuboideas y forman una monocapa. En su base, el citoplasma de estas células se extiende para solaparse con las células musculares lisas del músculo dilatador, excepto en la zona detrás del esfínter, donde el músculo dilatador está ausente. Las células columnares de la capa posterior del epitelio pigmentario se unen desde su ápex con el ápex de las células de la capa anterior.

1.2. El cuerpo ciliar

Anatomía

El cuerpo ciliar tiene una anchura aproximada de 6 mm y se extiende desde la base del iris hasta continuarse posteriormente con la coroides, el epitelio pigmentario de la retina y la retina neurosensorial, a nivel de la ora serrata.

En una sección sagital aparece como un triángulo que tiene un pico en el espolón escleral, otro en el ápex del primer proceso ciliar y otro en la ora serrata. Está formado por dos zonas: la pars plicata y la pars plana. La pars plicata (o corona ciliar) forma los 2 mm anteriores del cuerpo ciliar y contiene los procesos ciliares, que son crestas irregulares radiales, de 2 mm de largo y 0.8 mm de altura, en un número aproximado de 70. La pars plana (o ciliar orbicular) es la parte posterior y aplanada del cuerpo ciliar, de aproximadamente 4 mm de longitud.

Histología

El cuerpo ciliar puede dividirse histológicamente en siete capas:

1ª) La más externa, denominada lámina fusca o tejido supracoroideo, es un espacio virtual entre la esclera y el cuerpo ciliar.

2ª) Los músculos ciliares se dividen en tres grupos de fibras. En la zona externa, el músculo de Brücke forma la porción longitudinal que se une anteriormente al espolón escleral y a la malla trabecular. En la zona interna, el músculo de Müller forma la porción circular. La porción radial está formada por algunas fibras del músculo

longitudinal de Brücke, que discurre oblicuamente para continuarse con las fibras circulares.

3ª) La capa vascular es una continuación directa de la capa vascular de la coroides.

4ª) La membrana basal del epitelio pigmentario ciliar (lámina vítrea) es una estructura gruesa que tiene un patrón reticular.

5ª) El epitelio pigmentario ciliar es la capa más externa del epitelio ciliar y es una continuación del epitelio pigmentario de la retina. Está unido firmemente por su ápex a la superficie apical del epitelio ciliar no pigmentado.

6ª) El epitelio ciliar no pigmentado es la capa más interna del epitelio ciliar y es una continuación de la retina neurosensorial. Va adquiriendo pigmento conforme se aproxima a la raíz del iris.

7ª) La membrana basal del epitelio ciliar no pigmentado es una malla compleja, a la cual se unen las fibras zonulares del cristalino. Con el envejecimiento, el cuerpo ciliar muestra hialinización de los procesos ciliares y de las porciones circulares del músculo ciliar e hiperplasia nodular del epitelio no pigmentado de la pars plicata.

Una de las funciones más importantes del cuerpo ciliar es la producción de humor acuoso. La producción del ácido hialurónico del vítreo es atribuida al epitelio ciliar no pigmentado de la pars plana.

1.3. La coroides

Anatomía

La coroides es el tejido vascular y pigmentado que forma la cubierta media de la parte posterior del ojo. Se extiende desde la ora serrata al nervio óptico y se une a la esclera por medio de bandas de tejido conectivo. Posteriormente, los vasos sanguíneos y nervios ciliares entran a la coroides procedentes de la esclera, anclando en esos puntos la coroides a la esclera. La coroides varía en grosor, desde 0.1 mm anteriormente a 0.2 mm posteriormente. Pequeñas cantidades de tejido coroideo (incluyendo melanocitos) se extienden dentro de los canales esclerales, a través de los cuales entran los vasos y nervios ciliares al ojo. En individuos muy pigmentados, se pueden observar melanocitos en las capas internas de la esclera y en la lámina cribosa del nervio óptico.

Histología

La coroides tiene cuatro capas:

1ª) La capa externa (o lámina fusca), formada por colágeno, así como fibras elásticas, fibrocitos y un gran número de melanocitos. Es un espacio virtual entre la esclera y la coroides cuando se desprende esta última.

2ª) El estroma contiene arterias y venas dentro de una matriz fibrosa laxa que contiene melanocitos. Las arterias disminuyen de calibre a medida que se aproximan a la coriocapilar.

3ª) La coriocapilar (o coriocapilaris) es la capa capilar de la coroides y da sustento al epitelio pigmentario y a las capas externas retinianas, incluyendo la capa de fotorreceptores, la capa plexiforme externa y la zona externa de la capa nuclear interna. La coriocapilar se organiza en lóbulos.

4ª) La membrana de Bruch está formada por cinco componentes: membrana basal del epitelio pigmentario de la retina (que algunos la consideran como parte de la retina), banda interna de colágeno, capa elástica, banda externa de colágeno y membrana basal del endotelio de la coriocapilar.

2. TUMORES MELANOCÍTICOS DEL TRACTO UVEAL

2.1 Melanocitos uveales

Definición

El melanocito es una célula madura que produce y contiene melanina. Los melanocitos generalmente se clasifican de acuerdo a su distribución anatómica: epidérmicos, meníngeos y úveales. Los melanocitos deben diferenciarse de otras células relacionadas: 1) el melanoblasto, que es una célula embrionaria potencialmente capaz de producir melanina; 2) el melanófago, que es un macrófago que ha fagocitado melanina; 3) el melanóforo, que es una célula productora de pigmento en animales más primitivos en la escala filogenética, y 4) las células pigmentadas de forma casual, como las células basales de la epidermis normal.

En el ojo hay tres grupos de células pigmentadas: 1) las células del epitelio pigmentario de la retina, que rara vez dan lugar a neoplasias; 2) los melanocitos conjuntivales, y 3) los melanocitos uveales, que se consideran como las células de origen del melanoma que se desarrolla en estos tejidos.

Los melanocitos de la úvea son células de forma dendrítica, variablemente pigmentadas, distribuidas en el estroma del iris, cuerpo ciliar y coroides. Ocasionalmente pueden identificarse en los canales emisarios de la esclera e incluso en los tejidos epiesclerales. La densidad y pigmentación de los melanocitos uveales es la responsable del color del iris y la coroides observados clínicamente.

Origen embriológico

Los melanocitos uveales comparten un origen embriológico común con los conjuntivales y cutáneos; se originan en la cresta neural y emigran a su localización definitiva durante el desarrollo embriológico. A diferencia de las células del epitelio pigmentario, que comienzan a elaborar melanina muy precozmente durante la vida embrionaria, los melanocitos uveales no empiezan a producirla hasta las etapas más tardías, o incluso hasta después del nacimiento.

2.2. Lesiones melanocíticas de la úvea

Una lesión melanocítica uveal es cualquier condición benigna o maligna que presumiblemente tiene origen en los melanocitos uveales.

Peca

Se trata de un cúmulo de células melanocíticas que no distorsiona la arquitectura uveal, pudiendo localizarse en el iris o en la coroides. Estos agregados celulares pueden estar presentes en el nacimiento, pero no aparecer clínicamente pigmentados hasta etapas más avanzadas de la vida. No se sabe con certeza si las pecas uveales tienen posibilidades de transformación maligna.

Nevus

Se trata de un tumor benigno compuesto por melanocitos uveales. Al contrario que la peca, el nevus es una lesión ocupante de espacio, que sustituye o

distorsiona focalmente la arquitectura uveal. El nevus tiene un potencial muy bajo, pero sí definido, de transformación maligna.

Melanocitosis ocular

La *melanocitosis ocular congénita* está clásicamente dividida en dos categorías: melanocitosis ocular pura y melanocitosis oculodérmica. Los hallazgos oculares son similares en las dos variantes, pero la última se caracteriza por una pigmentación cutánea periocular adicional. Ambas condiciones predisponen al paciente al melanoma uveal, así como al melanoma de la órbita ipsilateral, meninges y sistema nervioso central.

Son entidades típicamente unilaterales, congénitas, en las que hay hiperpigmentación de la epiesclera y del tracto uveal en la forma ocular y de la piel periorbitaria en la oculodérmica. Ambas condiciones son más frecuentes en mujeres y se ha encontrado más prevalencia en orientales.

La *melanosis oculi* es una condición congénita caracterizada por una hiperpigmentación difusa de la epiesclera y el tracto uveal. La pigmentación epiescleral consiste en una o más áreas no sobrelevadas de coloración entre gris pizarra y marrón. En el ojo afecto, el tracto uveal puede estar hiperpigmentado, de forma difusa o con una distribución en sector. La afectación difusa del iris produce heterocromía hiperocrómica ipsilateral; cuando la coroides está difusamente afectada, la pigmentación del fondo de ojo afecto es más intensa que la del contralateral, condición que suele denominarse heterocromía coroidea.

Histológicamente, los ojos con melanocitosis ocular presentan una densa concentración de melanocitos toscos e intensamente pigmentados en iris, cuerpo ciliar y coroides.

El melanoma maligno que aparece en pacientes con melanocitosis ocular generalmente se origina en coroides, en cuerpo ciliar o en ambos. La localización en el iris es extremadamente rara y no han sido descritos melanomas originados en la epiesclera. El tumor asociado a esta condición se muestra histológicamente idéntico a otros melanomas uveales.

La *melanocitosis oculodérmica (nevus de Ota)* difiere de la melanocitosis ocular por la presencia de pigmentación de la piel periocular, así como de los tejidos epiesclerales. El grado de pigmentación cutánea puede variar desde un nevus pequeño

y circunscrito a una afectación generalizada de ambos párpados, superior e inferior. Se presenta en mujeres en el 80% de los casos y, aunque es más común en negros y asiáticos, la mayoría de los pacientes afectados que desarrollan melanoma son de raza blanca. El melanoma maligno que aparece en pacientes con melanocitosis oculodérmica puede localizarse en piel, iris, cuerpo ciliar, coroides, órbita, meninges y cerebro.

Debido al riesgo incrementado de desarrollar melanoma en áreas de hiperpigmentación, los pacientes con melanocitosis, tanto ocular como oculodérmica, deben tener un seguimiento estrecho, recomendándose un examen ocular completo cada seis o doce meses.

Melanoma primario

El melanoma primario del tracto uveal (iris, cuerpo ciliar y coroides) es un tumor maligno compuesto por melanocitos uveales. En raras circunstancias, un melanoma uveal puede ser secundario, debido a metástasis en la úvea de un melanoma de origen cutáneo primario (Gündüz et al., 1998). A diferencia de otras lesiones melanocíticas, el melanoma tiene capacidad de crecer, alterar marcadamente la arquitectura uveal y de otras estructuras intraoculares y, finalmente, metastatizar en órganos distantes.

2.3 Clasificación cito-histopatológica

Los tumores melanocíticos del tracto uveal han sido clasificados en diversos tipos citológicos. La clasificación de los nevus tiene poca repercusión clínica, mientras que la del melanoma úveal es un importante factor pronóstico.

Nevus

Los nevus de coroides pueden estar formados por los siguientes tipos celulares:

1) Nevus de *células poliédricas gruesas*: es el tipo celular más frecuente; son células intensamente pigmentadas, que, tras el blanqueo de la melanina, muestran una morfología redonda u oval, con núcleos pequeños, redondeados y uniformes.

2) Nevus de *células fusiformes finas*: es el segundo tipo celular en frecuencia en el nevus de coroides; son células pequeñas, fusiformes, con un núcleo fino, basófilo, y tienen poco o ningún pigmento.

3) Nevus de *células fusiformes gruesas y dendríticas*: estas células representan una variedad intermedia entre los dos primeros tipos; son característicamente menos pigmentadas que las primeras, pero más ovales o redondeadas que las segundas.

4) Nevus de *células “balonizantes”*: son las menos comunes, encontrándose sólo en el 4% de los nevus coroides; son células grandes, con abundante citoplasma espumoso y sin pigmento, similares a las células balonizantes observadas en ciertos nevus cutáneos.

Melanoma

-Tipos celulares:

Se reconocen dos tipos celulares principales en los melanomas uveales: fusiformes y epitelioides (Callender, 1993; Yanoff y Fine, 1996). Las de tipo fusocelular son alargadas en morfología y están generalmente dispuestas en haces estrechamente cohesivos; las membranas celulares son indistinguibles, dando el aspecto de sincitio; el citoplasma tiene un carácter fibrilar o finamente granular. Callender (1993) identificó dos subtipos de células fusiformes, basándose en características nucleares: 1º) El subtipo A tiene un núcleo delgado con cromatina fina y nucleolo indistinguible; a menudo hay un pliegue o “hendidura” longitudinal en la envoltura nuclear, que da la apariencia de una “cromatina rayada”; no se observan mitosis. 2º) El subtipo B tiene un núcleo más grande, cromatina más grosera y un nucleolo eosinofílico más prominente, que ocasionalmente presenta figuras mitóticas. Es decir, la actividad mitótica es muy rara en las células del patrón fusiforme A e infrecuente en las del patrón B.

Las células *epitelioides* son más grandes y más pleomórficas que las de tipo fusiforme. Generalmente, tienen abundante citoplasma eosinófilo, vidrioso, dando a la célula su forma redonda o poliédrica; tienen un borde distinguible, con una membrana celular más claramente delimitada, y a menudo con espacio extracelular entre células adyacentes. La cohesividad entre las células es mucho menor que en las de tipo

fusiforme; esta pérdida de cohesión es característica del tipo epitelioides y es uno de los hechos principales que las distingue del tipo fusiforme. Otras características distintivas son los núcleos: más redondos y más grandes, con bordes angulares, indentaciones irregulares y excrescencias; la cromatina es muy grosera y periférica; el nucleolo es prominente; a veces pueden verse células epitelioides multinucleadas y “bizarras”. La actividad mitótica es generalmente mayor en las células epitelioides que en las fusiformes, presentando figuras mitóticas. En todos los tipos de células del melanoma la pigmentación puede ser variable.

Dithmar et al. (2002) correlacionaron la expresión del antígeno HLA clase I con el tipo histológico celular en melanomas uveales, afirmando que las células fusiformes expresan menos el HLA I que las epitelioides. Alteraciones en la expresión del HLA pueden jugar cierto papel en el curso del melanoma uveal, debido a que estos antígenos son mediadores en la interacción entre las células tumorales y las células T y NK (Ericsson et al., 2001) .

-Clasificación de Callender:

En 1931, Callender propuso una clasificación de los melanomas malignos de úvea, basada en los hallazgos citológicos e histopatológicos. Este autor (Callender 1931; Callender et al., 1942), sus colaboradores (Wilder y Paul, 1951) y sucesores en el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (AFIP) de Estados Unidos de Norteamérica (Gamel et al., 1992; McLean et al., 1977; McLean et al., 1982), así como otros investigadores (Hayton et al., 1989; Jensen, 1970; Rahi y Agrawal, 1977; Raivio, 1977; Shamma y Blodi, 1977) han podido demostrar el valor pronóstico de esta clasificación.

Callender et al. (1942) clasificaron los melanomas malignos de úvea en seis grupos, cuatro de éstos estaban basados en el aspecto citológico del tumor y dos grupos adicionales en hechos histológicos. Los cuatro basados en citología fueron: tumores constituidos por células fusiformes tipo A, tumores formados por células fusiformes tipo B, tumores compuestos por células epitelioides y tumores mixtos, en los que se advierte una mezcla variable de células fusiformes y epitelioides. El quinto grupo consistía en tumores con un patrón fascicular donde las células están dispuestas formando haces o fascículos, un patrón más fácilmente apreciado en la microscopía óptica a bajo aumento; las células pueden ser fusiformes A, fusiformes B, o una

combinación de ambas. El sexto grupo estaba compuesto por tumores necróticos; un tumor es clasificado como necrótico cuando presenta un componente necrótico tan extenso que impide determinar adecuadamente el tipo celular y no permite ser clasificado en alguno de los grupos anteriores.

Muchos autores documentaron la frecuencia y significado pronóstico de las seis clases de melanoma uveal. Wilder y Paul (1951) estudiaron 1.064 casos de melanoma uveal con al menos 5 años de seguimiento en el Registro de Patología Oftálmica (ROP) de los Estados Unidos de Norteamérica. Los tumores de tipo celular mixto fueron los más comunes, representando aproximadamente la mitad (48%) de los melanomas malignos uveales. Los siguientes más prevalentes, suponiendo un tercio (32%), fueron los tumores de células fusiformes tipo B. Los porcentajes de tumores de tipos necrótico, fusiforme A, fascicular y epitelioides representaron el 8%, 6%, 5%, y 2%, respectivamente.

-Clasificación de Callender modificada:

Aunque la clasificación de Callender (1993) ha sido utilizada en la mayoría de los laboratorios de patología oftálmica durante años, es criticada tanto por ser demasiado complicada como por ser muy simple. Investigadores posteriores en el AFIP han simplificado la clasificación de Callender: excluyendo el tipo fascicular, uniendo los dos tipos de tumores fusiformes A y B, y combinando los tipos mixto y epitelioides.

En diversos trabajos se llamó la atención sobre ciertos problemas que presentaba esta clasificación (Augsburger et al., 1990; Gamel et al., 1977; McLean et al., 1977; McLean et al., 1983; McLean, 1978; Zimmerman, 1986).

El diagnóstico del tipo fascicular planteó dificultades, ya que su valoración no estaba fundamentada en criterios citológicos sino en un patrón histológico. Aunque la mayoría de los tumores fasciculares están compuestos por una mezcla de células fusiformes del tipo A y del tipo B, algunos contienen sólo células del tipo A, mientras que otros son del tipo B. En 1962, Paul et al. argumentaron que el pronóstico para pacientes con tumores de los tipos fascicular y fusiforme B era similar y combinaron ambas clases para el análisis estadístico. Desde 1962, los tumores fasciculares han sido clasificados en el AFIP según su composición citológica.

En 1978, McLean et al. reexaminaron 105 tumores originalmente clasificados como tipo fusiforme A por sus predecesores en el AFIP. El propósito de este estudio fue investigar dos problemas de la clasificación de Callender: 1º) la dificultad para distinguir un melanoma de células fusiformes del tipo A de un nevus (Gass, 1977; Jensen 1963) y 2º) no había criterios claros para clasificar los tumores compuestos por una mezcla de células fusiformes A y B. En su estudio, McLean et al. (1978) encontraron que 15 de los 105 tumores originalmente clasificados como fusiformes tipo A fueron citológicamente benignos; estos tumores estaban constituidos por células de morfología fusiforme, que tenían una baja relación núcleo-citoplasma y menos hipercromatismo nuclear que las células citológicamente malignas del tipo A. Dado que ninguno de los pacientes con estos tumores murieron, los autores los reclasificaron como nevus de células fusiformes (McLean et al., 1978) ; además, ellos documentaron muchos ejemplos de tumores compuestos de células histológicamente malignas del tipo A, sin células del tipo B o epitelioides, que murieron por metástasis. La conclusión más importante de esta revisión fué que los melanomas del tipo fusiforme A de Callender representaban un espectro en los que se habían incluido tanto benignos como malignos. Puesto que el pronóstico de los tumores citológicamente malignos del tipo A es similar al del tipo B, McLean et al. (1978) recomendaron que los tipos de células fusiformes A y B se unieran y se denominaran melanomas de células fusiformes. Esta designación también elimina el problema de clasificar a los tumores compuestos de una mezcla de dichas células.

Gass (1977) consideraba que la forma de realizar el diagnóstico era muy poco objetiva, ya que Callender no estableció claramente los criterios para diferenciar los tumores fusiformes y epitelioides puros de aquellos que consideró mixtos. McLean et al. (1983) estudiaron 100 melanomas diagnosticados según la clasificación de Callender y valoraron una nueva clasificación en relación con la supervivencia de estos enfermos. Revisaron en los melanomas de tipo mixto la relación entre el porcentaje de células epitelioides y el pronóstico de estos tumores y no encontraron una relación significativa. Estos autores agruparon los tumores melanocíticos de la úvea en: nevus de células fusiformes, melanoma de células fusiformes y melanomas mixtos. El seguimiento a los 15 años reveló una diferencia significativa en las tasas de mortalidad en estos tres grupos, oscilando entre el 0% en los nevus de células fusiformes y casi el 50% en el grupo de melanomas de células mixtas.

El tipo de células mixtas de Callender causa problemas adicionales. No hay acuerdo en qué porcentaje de las células tienen que ser epitelioideas para clasificar un tumor como del tipo mixto; y así, en algunos estudios el diagnóstico de melanoma de células mixtas se reserva para tumores con al menos un 5% de células epitelioideas. A causa de esta complejidad hay poco acuerdo entre patólogos cuando usan la clasificación de Callender. Los tumores tipo epitelioide son raros porque casi todos los melanomas uveales contienen al menos unas pocas células con morfología fusiforme. Debido a la rareza y a la falta de consenso entre los patólogos oftálmicos respecto a la cantidad de componente de células fusiformes, es permisible en un tumor de tipo epitelioide la práctica actual del AFIP de designar como tipo mixto a todos los melanomas uveales que contienen células de tipo epitelioide cuando analizan los factores pronósticos.

El mayor problema con la clasificación es el que representa su simplificación, por lo que el esquema es difícil de reproducir, incluso entre experimentados patólogos oculares. La dificultad se debe a que las características citológicas de las células reflejan un espectro continuo que se resiste a la categorización artificial. Aunque Callender (1993) reconoció sólo tres tipos de células en los melanomas uveales, en realidad existe un espectro desde células fusiformes del tipo A hasta células epitelioideas bizarras anaplásicas. Dentro de este espectro están células de forma fusiforme a las que les falta cohesión. Estas células pueden tener un nucleolo relativamente grande, eosinófilo, característico de células epitelioideas. Hay también células poliédricas que son cohesivas, con citoplasma fibrilar y nucleolo relativamente pequeño eosinófilo, característico de las células fusiformes del tipo B. ¿Estas células deberían clasificarse según su forma o en función a otros hechos?

En definitiva, y de acuerdo con la clasificación más reciente (McLean, 1982; McLean, 1978), los tumores melanocíticos uveales se dividen en tres grupos: 1) nevus de células fusiformes, 2) melanomas de células fusiformes y 3) melanomas de células mixtas. Muchos autores creen que esta clasificación revisada debería ser empleada en la valoración histológica de los melanomas uveales (Shields, 1992). El tipo celular de Callender modificado por el AFIP es uno de los factores pronósticos más significativos (McLean et al., 1993; McLean, 1993).

3. MELANOMA UVEAL

El melanoma uveal tiene varios nombres descriptivos: melanosarcoma (para tumores de células fusiformes), melanocarcinoma (para tumores de células epitelioides), leucosarcoma (para los amelanóticos), angiosarcoma (para los tumores altamente vascularizados) y sarcoma de células gigantes (para tumores anaplásicos que contienen células gigantes irregulares, a menudo multinucleadas). En las últimas décadas, el término melanoma uveal ha ganado popularidad y es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Aunque algunos patólogos con el término “melanoma” incluyen tanto tumores melanocíticos benignos como malignos, actualmente para designar un melanoma (entre ellos el uveal) no es necesario añadir la palabra maligno a la de melanoma. Es decir, a los tumores melanocíticos benignos se les debe llamar “nevus” y a los malignos “melanomas” para evitar la confusión referida.

Virchow reconoció que el melanoma es un tumor de melanocitos y que estos tumores no siempre están pigmentados (Zimmerman, 1985). Tanto los tumores melanocíticos uveales benignos como los malignos muestran una gran variación en el grado de pigmentación. Mientras que los tumores amelanóticos provocan los mayores problemas a la hora del diagnóstico, es también problemático el diagnóstico de tumores muy pigmentados. Como ya se ha indicado, el ojo contiene dos tipos de células melanocíticas: melanocitos uveales y células pigmentadas de la retina, cuerpo ciliar e iris. Los tumores de estos dos orígenes diferentes tienen un pronóstico muy diferente y deben ser diferenciados.

Los tumores del epitelio pigmentario son denominados adenomas o carcinomas para diferenciarlos de los nevus y melanomas malignos de origen melanocítico uveal.

3.1 Epidemiología

Incidencia

El melanoma uveal, aunque es un cáncer poco común, es el tumor maligno primario intraocular más frecuente en adultos y presenta una incidencia elevada de metástasis (Abrahamsson, 1983; Gragoudas, 1992).

Los melanomas de iris son raros; constituyen el 8% de los melanomas de la úvea (Jensen, 1982; Raivio, 1977). Presentan un tamaño pequeño y una relativa benignidad histopatológica. Se tratan eficazmente mediante excisión local y raramente metastatizan (Rones y Zimmerman, 1958).

Los melanomas de coroides y cuerpo ciliar, en cambio, representan el 80 y 12%, respectivamente, de los melanomas de uveales y suponen una seria amenaza para la vida. Aproximadamente la mitad de los pacientes con un melanoma de úvea posterior morirán a causa de la enfermedad, 10 a 15 años después de la enucleación, y las metástasis, aunque suelen aparecer en los primeros 5 años tras el tratamiento, pueden observarse muchos años después (Jensen, 1982; Raivio, 1977).

La incidencia del melanoma maligno de coroides en la población general es baja (Huerta y Rodríguez, 2001). Actualmente se acepta, de forma general, que la incidencia anual estimada de melanoma uveal en los Estados Unidos de Norteamérica es de 6 casos por un millón de habitantes (Egan, 1988; Scotto et al., 1976).

La incidencia publicada de diversos estudios en la población blanca en EEUU de Norteamérica (Ecotto et al. 1976; Shields y Shields, 1992) y en distintos países de Europa es semejante (Abrahamsson, 1983, en Suecia; Jensen, 1982, en Dinamarca; Mork, 1961, en Noruega; Raivio, 1977, en Finlandia).

En E.E.U.U., la proporción de estos tumores en negros es menor de 1/8 con respecto a los blancos (Ecotto et al., 1976). La incidencia en negros africanos es desconocida, pero se piensa que es extremadamente baja (Mieler et al., 1981).

Mortalidad

La diseminación metastásica del melanoma uveal está asociada a un pronóstico extremadamente grave (Egan, 1988). La supervivencia tras el diagnóstico de metástasis hepáticas es de menos de 1 año, con una media de solamente entre 2 y 4 meses (Seddon et al., 1983). Aunque la mayor proporción de metástasis se presenta en los primeros 5 años tras la enucleación (especialmente entre los 2 y 3 primeros años), se conocen recidivas hasta 42 años después del tratamiento (Shields y Shields, 1992). Los pacientes tratados con radioterapia (introducida en los últimos 15 a 20 años) presentan en los primeros años después del tratamiento un porcentaje de metástasis comparable al de aquellos tratados mediante enucleación (Augsburger et al., 1990). Un

seguimiento a más largo plazo de pacientes radiados determinará si las metástasis continúan con tasas similares años más tarde post-tratamiento.

Los estudios de supervivencia más extensos, con un largo plazo de seguimiento tras la enucleación, se realizaron en Finlandia y Dinamarca. Raivio (1977) recopiló los datos de todos los pacientes diagnosticados de melanoma uveal en Finlandia, entre los años 1923 y 1966; de los 359 casos recogidos, se pudo conocer la supervivencia a los 10 años en todos (excepto en 5 pacientes); el seguimiento fue de 15 o más años en 314 casos (89%) y al menos de 20 años en 214 casos (60%). Los porcentajes de supervivencia a los 5, 10 y 15 años basados en muerte relacionada con el melanoma fueron de 65%, 52% y 46%, respectivamente. De los 42 pacientes que sobrevivieron al menos 20 años, 9 desarrollaron metástasis posteriormente. Jensen (1982) evaluó la supervivencia, al menos, 25 años después de la enucleación en pacientes daneses con melanoma uveal; de los enfermos incluidos en la serie original murieron el 82%, 150 de estos 292 pacientes (51%) debido a metástasis. Los porcentajes de supervivencia a los 5, 10 y 15 años fueron similares a los publicados por Raivio (1977).

Más recientemente, han sido publicados dos artículos que revisan la literatura existente. En uno de ellos (Markowitz et al., 1992), se revisan las publicaciones entre los años 1966 y 1988 sobre la mortalidad a los 5 años tras la enucleación de los melanomas coroideos, y los autores concluyen que en estos trabajos existen protocolos defectuosos (la edad del paciente sólo aparece en 69,7% de los trabajos, la mortalidad relacionada con el tamaño del tumor en el 34,2%, la localización del tumor en el 18,4%, etc.), que impiden deducir resultados estadísticamente válidos. En el otro artículo, de Diener-West et al. (1992), se realiza un meta-análisis con los datos aportados por esta literatura, concluyendo que los porcentajes de mortalidad, a los 5 años tras la enucleación, son del 16% para los melanomas pequeños, del 32% para los de tamaño medio y del 53% para los tumores grandes.

3.2 Factores etiológicos

Edad

La mayoría de los melanomas de la úvea posterior se diagnostican en pacientes con más de 50 años de edad, aunque los del iris se detectan algo más

precozmente. En raros casos, el melanoma uveal puede ser diagnosticado en niños mayores o adultos jóvenes (Barr et al., 1981; Paul et al., 1962). De acuerdo con los conocimientos actuales, los melanomas en jóvenes tienen un curso clínico y pronóstico similar o ligeramente más favorable que aquellos diagnosticados en individuos de edad más avanzada (Shields y Shields, 1992).

En la mayoría de las series, aunque la edad media de diagnóstico se sitúa alrededor de los 55 años, también se observa una disminución de la incidencia del tumor a partir de los 70 años (Jensen, 1963; Mork, 1961; Raivio, 1977). Esto contrasta con la mayoría de los cánceres en adultos, en los que hay un incremento exponencial de la incidencia con la edad, además de que el melanoma uveal tiende a ser diagnosticado casi una década antes.

Sexo

De forma global parece haber una ligera predilección de estos tumores para su aparición en varones (Jensen, 1963; Shamma, 1977). Yanoff y Zimmerman (1967) señalaron una proporción de 6:4 de varones:mujeres en un grupo de 100 ojos estudiados en el AFIP. Sin embargo, en el grupo de edad comprendido entre los 20 y 39 años es mayor la incidencia en mujeres (Egan et al., 1988; Sheddon et al., 1989; Bergman et al., 2002). Esta mayor proporción entre los varones sugiere un efecto genético-dependiente o exposiciones específicas relacionadas con la enfermedad que podrían ser ligeramente más frecuentes en varones.

Pigmentación racial y color del iris

Los tumores melanocíticos de la úvea tienen una fuerte predisposición a aparecer en individuos de raza blanca. Tanto nevus como melanomas de úvea son extremadamente raros en negros (Margo y McLean, 1984) y relativamente poco comunes en asiáticos (Kuo et al., 1982). En EE.UU. de Norteamérica, los blancos tienen 8 veces más riesgo de desarrollar un melanoma uveal que los negros (Scotto et al., 1976). En series de más de 4.000 casos de melanoma ocular recogidos en los archivos del AFIP, solamente 24 pacientes eran negros (Paul et al., 1962). Estudios sobre esta neoplasia en poblaciones africanas revelan también la baja incidencia en negros africanos (Miller et al., 1981). El riesgo de padecer melanoma uveal es también bajo en razas de pigmentación intermedia. En EE.UU. de Norteamérica este tumor es

raro entre los americanos de origen chino (Scotto et al., 1976) y nunca se informó de ningún caso de melanoma uveal en un indio nativo americano. En definitiva, existe una correlación inversa entre el grado de pigmentación y la probabilidad de desarrollar un melanoma de úvea, siendo este tumor raro entre razas no blancas.

Por otro lado, estudios diversos han mostrado que individuos con iris de color claro o poco pigmentado tienen un riesgo mayor de desarrollar melanoma uveal (Egan et al., 1988; Tucker et al., 1985). Esta observación, combinada con la evidencia de que la mayoría de los melanomas de iris aparecen en la porción inferior del mismo, implica la exposición a la luz solar como un posible factor contribuyente al desarrollo de melanomas uveales (Egan et al., 1988; Shields y Shields, 1992).

Lesiones predisponentes

-*Nevus uveal*: Parece haber evidencia clínica e histopatológica para sugerir que la mayoría de los melanomas uveales se originan de nevus uveales benignos pre-existentes. En casos raros, los melanomas han sido observados originarse "de novo", aparentemente de áreas de coroides que fueron previamente examinadas y encontradas como clínicamente normales (Sahel y Albert, 1994).

La incidencia de nevus coroides en la población general oscila entre el 1 y el 2 por ciento en varios estudios clínicos y el 6'5 por ciento en ojos en autopsia (Ganley y Comstock, 1973). Las investigaciones basadas en la valoración histopatológica obtienen prevalencias más elevadas. La infravaloración de los estudios clínicos puede estar relacionada con un ocultamiento de las lesiones por el EPR y la coriocapilar, la ausencia de contraste entre el nevus y la coroides normal circundante y la hipopigmentación de muchos nevus. Ciertos estudios han sugerido que aproximadamente el 90% de los nevus de coroides aparecen posteriores al ecuador; consecuentemente, tienen más probabilidades de ser detectados en un examen oftalmológico de rutina y de producir síntomas visuales por su proximidad a la fovea. Como los nevus también pueden presentarse con una localización anterior al ecuador, la prevalencia de éstos debe ser al menos dos veces superior a las cifras publicadas. Ganley y Comstock (1973) estimaron una incidencia de nevus del 3.1% en individuos

de más de 30 años de edad y calcularon que el riesgo de que un nevus determinado origine un melanoma de coroides es muy bajo (solamente 1 de cada 5.000 personas que presentan tales nevus desarrollan un melanoma cada año). Aunque el riesgo absoluto de melanoma uveal en individuos con nevus coroides es bajo, este riesgo podría ser mucho mayor que el de los individuos sin nevus de coroides (Sahel y Albert, 1994).

-Melanocitosis ocular congénita: Otra alteración melanocítica asociada al melanoma uveal es la melanocitosis ocular congénita, en su forma ocular (melanosis oculi) u oculodérmica (nevus de Ota). Esta condición es probablemente el factor predisponente más importante del melanoma uveal (Gonder et al. 1982). Varias observaciones tienden a apoyar el punto de vista de Yanoff (1996) y de otros autores, en el sentido de que ambos tipos de melanocitosis están etiológicamente ligadas al melanoma uveal, tal y como se había sugerido anteriormente (Egan et al., 1988; Shields y Shields, 1992; Yanoff y Zimmerman, 1967), por los siguientes motivos:

a) Se ha comunicado que el melanoma uveal aparece, según las series, entre un 5% y un 25% de personas con melanocitosis ocular .

b) Algunos casos de pacientes con melanocitosis presentaron melanomas coroides múltiples (o melanoma de úvea multifocal) en el mismo ojo.

c) Solamente un 5% de casos de nevus de Ota son bilaterales; no obstante, hay varios casos publicados de nevus de Ota bilaterales que desarrollaron melanoma uveal bilateral.

d) Parece haber una mayor tendencia para desarrollar el melanoma uveal en pacientes negros si éstos tienen melanocitosis oculodérmica.

e) Casi todos los casos publicados de melanoma en personas con melanocitosis, de cualquier tipo, lo han desarrollado en el ojo afecto por la misma.

En definitiva, aunque la incidencia de melanoma uveal entre pacientes con melanocitosis ocular congénita es incierta, se estima que es menos del 5% (Shields y Shields, 1992).

Factores genéticos y predisposición familiar

Aunque no hay factores genéticos claramente reconocidos, varias líneas de investigación sugieren una posible influencia genética en algunos casos. Mukai y Dryja (1986) demostraron recientemente la pérdida de alelos del cromosoma 2, en 2 de 15 pacientes con melanoma uveal. Estos hallazgos conducen a plantear que alelos mutantes, expresados solamente con pérdida del alelo homólogo, podrían ser responsables del desarrollo de algunos melanomas oculares.

Por otro lado, si bien el melanoma uveal familiar (MUF) es una entidad rara, unos pocos casos familiares (en torno a 15) han sido publicados (Canning y Hungerford, 1988; Young et al., 1994), desde la descripción inicial de Silcock (1892), en varios de los cuáles se afectaron más de dos generaciones. El modo de herencia ha sido descrito como autosómico dominante con penetrancia incompleta.. Fenotípicamente, los casos de MUF son similares a los casos no familiares. La única diferencia es en la edad media de presentación: los casos familiares se presentan a una edad más precoz comparados con los casos no familiares, existiendo una diferencia de 14'2 años en la edad media entre los 2 grupos, que es estadísticamente significativa (Canning y Hungerford, 1988).

Patología asociada/concurrente

-Síndrome del nevus displásico (sND cutáneo): Este síndrome define a un grupo de pacientes con múltiples nevus cutáneos atípicos con una posible historia familiar. Los pacientes con sND tienden con mayor tendencia a desarrollar melanoma cutáneo, apareciendo a una edad más precoz, y pueden tener múltiples melanomas primarios.

Parece que también hay una incidencia incrementada de nevus de conjuntiva, iris y coroides en pacientes con sND (Rodríguez-Sains, 1986). Hay controversia respecto a una asociación definida entre las dos entidades, aunque se han publicado casos de melanoma uveal en pacientes con sND (Oosterhius et al., 1982) y existen trabajos bien documentados de una relación entre ambas (Albert et al., 1985). Debido a esta asociación, se recomienda que pacientes que se presenten con un melanoma uveal sean interrogados y examinados buscando las características cutáneas del sND.

De forma similar, los pacientes con sND deberían ser explorados para descartar un melanoma uveal (Singh et al., 1993).

-Neurofibromatosis: Los pacientes con neurofibromatosis tienen un exceso de melanocitos en la piel y lesiones melanocíticas cutáneas características (manchas de “café con leche”). De forma similar, ha sido publicado un mayor número de nevus uveales en pacientes con neurofibromatosis. Esta asociación se ha fundamentado en el origen en la cresta neural de ambos melanocitos: uveales y cutáneos (Singh et al., 1993). La mayoría de los melanomas uveales en pacientes con neurofibromatosis han aparecido en el iris, aunque ocasionalmente han sido publicados melanomas de la úvea posterior (Specht y Smith, 1988; Wiznia et al.1978).

-Xeroderma pigmentosum: Estos pacientes tienen un mayor riesgo para el desarrollo de neoplasias inducidas por el sol (p.e., melanoma cutáneo), pero los únicos casos de melanomas oculares presentes en pacientes con este trastorno han sido un melanoma de conjuntiva (Egan et al., 1998) y un sólo caso registrado de melanoma de iris (Jonson et al., 1989).

Situación hormonal

El embarazo parece acelerar el crecimiento del melanoma cutáneo, quizás porque en esta situación se produce un exceso de hormona melanocito-estimulante (MSH). También ha sido referido el crecimiento del melanoma de coroides durante el embarazo, sugiriendo del mismo modo una posible influencia hormonal (Egan et al., 1988; Seddon et al., 1989). El embarazo puede también significar un riesgo añadido en relación con el melanoma uveal y, aunque son raros los casos que se presentan o crecen durante el embarazo, hay publicaciones que refieren un incremento de mortalidad debida a tumores oculares durante los años fértiles (Seddon et al., 1982).

Está bien establecida la dependencia de las hormonas esteroideas en varios cánceres (próstata, mama...) y se ha encontrado que los melanomas cutáneos tienen receptores citoplásmicos estrogénicos, que pueden indicar una dependencia esteroidea similar. Lo mismo podría sostenerse para los melanomas de úvea; sin embargo, las investigaciones acerca de receptores de estrógenos en melanomas uveales han resultado infructuosas, probablemente por la ausencia de receptores estrogénicos tanto

en melanomas coroideos como en el tejido coroideo adyacente (Seddon et al., 1982). Una posibilidad alternativa es que esté involucrada la MSH, que también puede jugar un papel permisivo en la acción de la luz ultravioleta en los melanocitos.

Además del embarazo, se ha evaluado el uso de anticonceptivos orales como potenciales determinantes de la supervivencia en un grupo de 139 mujeres con melanoma uveal tratadas mediante irradiación externa con protones acelerados; los resultados, aunque basados en un número limitado de casos, ofrecen cierta seguridad de que el embarazo y el uso de AOs no están relacionados con el riesgo de metástasis en mujeres diagnosticadas de melanoma uveal (Walsh et al., 1992).

Inmunocompetencia

Char (1978) revisó la literatura respecto al papel de la inmunología en la patogenia de los tumores oculares. La mayoría de los estudios sobre el tema se han dirigido a buscar la influencia de la respuesta inmune del huésped frente al crecimiento y la extensión metastásica de las células tumorales.

La inmunidad debilitada del huésped, quizás inducida por exposición ambiental, podría provocar el desarrollo del melanoma de la úvea. En humanos, la radiación ultravioleta puede actuar como un "carcinógeno permisivo", suprimiendo la vigilancia inmunológica del huésped. No se sabe si la inmunosupresión vía exposición a la luz solar podría desencadenar la formación de tumores en localizaciones relativamente poco expuestas como es el ojo (Egan et al. 1988).

Factores ambientales

Diversos factores de riesgo ambientales han sido implicados en la patogénesis del melanoma uveal (Egan et al. 1988):

-Nivel socioeconómico: el nivel socioeconómico se ha ligado a la presencia de mayor proporción de ciertos cánceres, incluyendo los melanomas cutáneos. Sin embargo, el papel del status socioeconómico no se ha estudiado directamente en el melanoma uveal. En un estudio sobre cánceres oculares en adultos, a partir de los 15 años de edad, apareció una relación con profesiones no manuales en la población de Inglaterra y Gales (Swerdlow, 1983).

-Factores geográficos: No está claro si el ámbito geográfico "per se" tiene alguna influencia en el desarrollo del melanoma uveal. Un estudio indicó que los pacientes nacidos en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica tenían un

incremento del riesgo tres veces mayor; sin embargo, el número de años residiendo en el sur no estaba relacionado con el riesgo de enfermedad, tras ajustarlo según lugar de nacimiento (Tucker et al., 1985). Además, el melanoma uveal también difiere del cutáneo en que no se ha visto un gradiente latitudinal marcado y consistente. Hay trabajos en los que los países con mayor incidencia fueron los situados a mayor distancia del ecuador, aunque este dato puede ser resultado de revisiones más completas en el norte. Scotto et al. (1976) concluyeron que la mayor incidencia observada en el sur de EE.UU. de Norteamérica se debía a que era la región más estudiada, y que no existía gradiente latitudinal para el melanoma uveal.

-Radiación actínica solar y de otras fuentes: La exposición a la luz del sol ha sido estudiada como potencial factor de riesgo ambiental en cierto número de enfermedades oculares, incluyendo la degeneración macular asociada a la edad, la catarata senil y, más recientemente, el melanoma del tracto uveal. Esta última ha sido asociada con la luz solar desde que se considera la exposición a ella como posible causa del melanoma cutáneo, ya que ambas enfermedades comparten un origen celular común: el melanocito. Varias líneas de investigación aportan evidencias, tanto a favor como en contra, de un papel de la luz solar en el desarrollo del melanoma uveal. Por un lado, hay observaciones sugestivas de que podría estar relacionado con la exposición solar (Tucker et al., 1985); entre otros datos, la mayoría de los melanomas de iris están localizados en la porción inferior del mismo, que tiene mayor exposición a la luz solar que la superior, protegida por el párpado. No obstante, el incremento de incidencia de melanomas cutáneos en pacientes que toman el sol o se broncean artificialmente no ha sido observado en melanomas uveales (Egan et al. 1988).

Otras posibles fuentes de radiación son las radiaciones ionizantes, las luces fluorescentes y las lámparas de bronceado. No hay estudios publicados al respecto o no son estadísticamente significativos (Egan et al., 1988; Jensen, 1963; Tucker et al., 1985).

-Exposiciones ocupacionales y químicas: Aunque algunos cánceres han sido relacionados con exposiciones químicas y ocupacionales, existen pocos datos convincentes de que los melanomas uveales estén implicados en tales exposiciones. La única exposición ocupacional que ha sido asociada al melanoma uveal es la soldadura; y así, un estudio presentó un cierto incremento de incidencia entre soldadores (Tucker et al., 1985). Otro grupo de casos fue observado en una planta industrial, sin poder ser determinar algún agente específico, y, finalmente, en un pequeño número de casos en

una población se intentó relacionarlos con el suministro de agua corriente, pero no resultó convincente (Egan et al., 1988; Seddon et al., 1989).

-*Virus*: Albert (1979) ha apuntado la posibilidad de una etiología viral para el melanoma uveal, basándose en que: a) tumores similares al melanoma uveal han sido inducidos en animales de laboratorio, tras la inyección de tejido uveal neoplásico; éste había sido transformado "in vitro" mediante ADN oncogénico de virus, y b) en melanomas uveales humanos han sido identificados virus y partículas virales; sin embargo, el significado de estos hallazgos no está claro, ya que las partículas víricas son constituyentes frecuentes de tejidos normales y en cánceres en los que sin relación demostrada una etiología viral.

-*Trauma*: Existen algunas publicaciones sobre el desarrollo de melanoma uveal en el lugar de una lesión previa del globo ocular; entre otros casos descritos, Shields y Shields (1992) observaron un caso de melanoma de cuerpo ciliar que se desarrolló en una mujer varios años después de un traumatismo penetrante en la misma localización. No se sabe cómo podría predisponer al desarrollo tumoral; sin embargo, hasta que no se haya establecido que la tasa de lesiones previas en un grupo control es similar a la de los pacientes con la enfermedad, el trauma no puede ser descartado como causa de melanoma uveal (Egan et al. 1988).

-*Aparición en parejas ("connubial")*: Algunas formas de cáncer han sido observadas en marido y mujer, y esta relación ha sido reconocida en el melanoma de coroides (Shields et al., 1984). Aunque parece ser algo más que una coincidencia, el significado de estos casos es no está claro.

3.3 Historia natural del melanoma uveal

El melanoma uveal es un tumor infrecuente, pero potencialmente mortal. La mayoría de los investigadores presentan aproximadamente un 20%-30% de enfermedad recidivante (más o menos extensa) a los 5 años y en general, la tasa de mortalidad es de 46% tras 15 años (Gragoudas et al., 1992; Gragoudas et al., 1994; Seddon et al., 1994; Willson et al., 1989). Desafortunadamente para la mayoría de los pacientes, la mejor opción de tratamiento no se conoce, ya que apropiados ensayos clínicos controlados no han sido llevados a cabo (Gamel et al., 1992).

La historia natural, en el sentido del curso clínico que sigue una enfermedad en ausencia de intervención alguna, no ha sido descrita en el melanoma uveal (Brattain et al., 1994). Ésta es difícil de evaluar, ya que la mayoría de los pacientes son tratados poco después del diagnóstico, clásicamente mediante enucleación y, recientemente, también con métodos conservadores. Además, existen pocos datos disponibles sobre las características y patrón de crecimiento del melanoma uveal, y no está claro en que estadio hay más probabilidades de que aparezcan las metástasis.

En definitiva, hay una serie de cuestiones acerca de la biología del tumor que siguen sin respuesta; sin embargo, datos obtenidos de estudios observacionales han permitido obtener algunas ideas o conclusiones útiles.

Lesiones precursoras

Se considera que la mayoría de los melanomas coroideos se originan de nevus coroideos preexistentes, aunque existen casos documentados de melanomas que se originan "de novo" (Sahel et al., 1988). Las estimaciones sobre la prevalencia de nevus en la población general adulta oscilan entre un 1% y un 32%. Aunque los nevus uveales son frecuentes, el riesgo de transformación maligna es muy pequeño: empleando una prevalencia estimada de 3.2%, Ganley y Comstock (1973) determinaron que 1 de cada 5000 individuos con nevus desarrollará un melanoma coroideo por año. Se sabe muy poco sobre las características de un nevus con más tendencia a la transformación maligna y se encuentra aún mayor dificultad en distinguir nevus de melanomas coroideos pequeños.

El crecimiento de las lesiones névicas coroideas puede ser una señal de transformación maligna de las mismas. Diversos investigadores han identificado

factores que distinguen nevus coroideos benignos de nevus sospechosos (p.e., lesiones que aumentan de tamaño durante el seguimiento). En un estudio con un seguimiento de 4 años (Mims y Shields, 1978), dos o más de las siguientes características estaban presentes sólo entre los nevus que aumentaban de tamaño: 1°) Diámetro mayor entre 3.5 y 7.5 mm; 2°) Altura entre 1- 2 mm, y 3°) Pigmento naranja en la superficie del tumor y otros efectos en estructuras suprayacentes. En otra serie (Augsburger, 1993), la incidencia de crecimiento de los nevus a los 5 años fue 4.5% para lesiones clasificadas como benignas y 14% en lesiones clasificadas como "sospechosas" en el examen inicial.

Por otro lado, los nevus coroideos son las neoplasias que con más frecuencia se diagnostican erróneamente como melanomas (Chang et al, 1984). En ausencia de crecimiento o acúmulo de líquido subretiniano (LSR), ambos pueden ser indistinguibles; incluso en presencia de ambas características el diagnóstico puede no ser cierto (Gragoudas et al., 1994). Pequeños tumores melanocíticos coroideos que crecen durante la observación resultan ser mucho más frecuentemente melanomas malignos. Los nevus sospechosos son lesiones de dimensiones similares que pueden aumentar de tamaño o permanecer estables durante largos periodos de observación; sin embargo, éstos pueden crecer bajo la influencia de estímulos hormonales (como en el embarazo) y también ha sido observado crecimiento en ausencia de transformación maligna. Un melanoma pequeño puede ser sospechado en presencia de las siguientes características: 1°) crecimiento documentado en seguimiento seriado; 2°) altura superior a 1.5 mm; 3°) pigmento naranja visible sobre el tumor; 4°) presencia de un desprendimiento de retina (DR) exudativo, en ausencia de drusas o neovascularización coroidea, y 5°) angiografía fluoresceínica (AFG) con múltiples fugas subretinianas puntiformes, que aumentan progresivamente hasta ocasionar una tinción tardía.

Características del crecimiento

Algunas conclusiones respecto a la historia natural de los melanomas de coroides han resultado de pacientes inicialmente "manejados" mediante observación. En una serie de 116 tumores seguidos durante un periodo mínimo de 5 años (Gass, 1980) y que no habían recibido tratamiento alguno durante un periodo mínimo de 4 meses, el 40% crecieron durante el plazo de observación, mientras que el 60% restante no mostró crecimiento significativo. El porcentaje de tumores que crecía aumentaba en

proporción al tamaño tumoral; así, tuvieron crecimiento documentado: el 36% de los tumores pequeños; el 55% de los tumores de mediano tamaño, y el 100% de los tumores grandes.

Existen pocos datos disponibles sobre las tasas de crecimiento de los melanomas uveales (Chang et al., 1984); en particular, no se dispone de estimaciones fiables de la media del tiempo de duplicación del tumor. Los escasos estudios en los que tumores en crecimiento fueron medidos de forma seriada sugieren que los patrones de crecimiento en los melanomas de coroides son extremadamente variables.

Extensión local y metástasis

La relación entre extensión fuera del ojo, recidiva orbitaria y metástasis no es tan importante en el melanoma maligno como es en el retinoblastoma (Shields y Shields, 1991). El mayor significado de la extensión extraocular resulta de la asociación con otros hechos del tumor. Los tumores grandes y que contienen células epitelioides son más propensos a tener extensión extraocular. La localización anatómica tiene también profunda influencia en su comportamiento. Los melanomas de iris, son frecuentemente de la variedad fusiforme A, tienen un lento crecimiento y son relativamente “benignos”, con metástasis relativamente raras; por el contrario, las metástasis de los melanomas de coroides y cuerpo ciliar son mucho más comunes.

Las principales rutas de diseminación son la extensión local y a través del torrente sanguíneo. La explicación de esta conducta biológica se basa en que el globo ocular (y el tracto uveal) carece de drenaje linfático y en la capacidad de invasión precoz de los vasos sanguíneos de las células del melanoma. Cuando es observada afectación de ganglios linfáticos regionales (ganglios preariculares, submandibulares, y cervicales) es que ha ocurrido extensión subconjuntival del tumor primario.

Al menos el 30% de los pacientes con melanomas de la úvea posterior mueren finalmente de enfermedad metastásica a pesar de un tratamiento aparentemente satisfactorio. En la mayoría de los casos, la causa de muerte está en

relación con la metástasis hematogena al hígado. La esperanza de vida de pacientes con metástasis es generalmente de menos de 1 año (Gragoudas et al., 1991).

El plazo de tiempo entre el tratamiento del melanoma primario y la detección clínica del melanoma metastásico es extremadamente variable. Las metástasis documentadas son raras en el momento de la presentación del tumor primario (menos del 1 %); pero, con largo tiempo de seguimiento, se desarrollarán en la mayoría de los pacientes. En casi todas las series, las tasas anuales de metástasis alcanzan un máximo en el segundo o tercer año post-enucleación y descienden a niveles bajos posteriormente. Estas observaciones llevaron a Zimmerman (1978) a proponer que la cirugía en sí estaba contribuyendo a la diseminación del tumor. Sin embargo, Siegel et al. (1979) demostraron los mismos patrones de mortalidad en un amplio espectro de tipos tumorales, sugiriendo que la enucleación no estaba contribuyendo sustancialmente a las tasas de muerte por melanoma. Los pacientes podían ser diagnosticados de metástasis décadas después del tratamiento, indicando que la proliferación de focos metastásicos estaría bajo control inmunológico o mediada por algunos otros factores de huésped.

Las metástasis sistémicas son generalmente hematógenas en origen y el hígado es la localización más común: en dos tercios de los pacientes, aproximadamente, el hígado es el único foco detectable de metástasis. Además de este órgano, focos pulmonares, subcutáneos y óseos son también frecuentes. Lorigan et al. (1991) estudiaron la localización de las metástasis empleando técnicas de diagnóstico por imagen en 110 pacientes con melanoma uveal metastásico. La metástasis hepática se desarrolló en 101 pacientes (92%). El hígado estaba afecto inicialmente en 94 pacientes (85%) y fue foco metastásico inicial aislado en 60 pacientes (55%). Sólo un paciente tuvo inicialmente metástasis en ganglios linfáticos aislados en el mediastino. Los ganglios linfáticos abdominales y axilares estaban afectados secundariamente a metástasis hepática y pulmonar en 13 pacientes (12%). Sólo unos pocos casos se extendieron hacia ganglios linfáticos regionales y en ninguno de éstos el paciente murió por extensión local. Esto sugiere que la biología de la metástasis del melanoma uveal es diferente de la del melanoma cutáneo y retinoblastoma, los cuales son más propensos a invadir localmente y extenderse hacia ganglios linfáticos regionales. La alta prevalencia de metástasis hepática en melanoma uveal no puede ser explicada por

drenaje venoso e indica un proceso de selección o receptividad biológica de las células tumorales diseminadas.

Jensen (1963) observó que, de 38 casos en los que se realizó la autopsia, el hígado estaba afectado en 37 casos, y en 13 de ellos fue la única localización sin evidencia de metástasis a otros órganos. Este autor encontró que el pulmón era la segunda localización más frecuente en la enfermedad metastásica.

3.4 Características clínicas

Melanoma del iris

Los melanomas del iris pueden ser dos formas o *tipos clínico-patológicos*: circunscrito y difuso:

-Circunscrito: Puede afectar estructuras oculares adyacentes, causando distorsión pupilar progresiva, siembra en el acuoso, invasión de la malla trabecular o del cuerpo ciliar y catarata en sector en el cuadrante de la lesión. Estas características no son patognomónicas de melanomas, porque frecuentemente son también observadas en nevus estables. Puede ser difíciles de diferenciar clínicamente de nevus del iris; sin embargo, si una lesión melanocítica muestra evidencia inequívoca de crecimiento, es apropiado hacer el diagnóstico de melanoma. Otras características clínicas que pueden sugerir malignidad incluyen: tamaño grande del tumor con inicio de pérdida visual, excesiva vascularización con hifema espontáneo y compresión de la córnea, con edema corneal secundario y queratopatía en banda. Tal como se indicó previamente, hay una marcada tendencia del melanoma circunscrito a localizarse en la porción inferior del iris, encontrándose más del 80% de estos tumores en esta localización (Rones y Zimmerman, 1958).

-Difuso: El melanoma difuso del iris, menos frecuente, suele producir un cuadro clínico clásico de heterocromía hiperocrómica y glaucoma secundario ipsilateral (Demirci et al., 2002a). El examen con lámpara de hendidura revela un engrosamiento irregular del iris, con una desaparición de las criptas; la gonioscopia muestra una nodularidad en el ángulo iridocorneal, particularmente en el cuadrante inferior. Las

estructuras afectadas acaban densamente pigmentadas, pudiendo originar un glaucoma secundario, con excavación del disco óptico y pérdida visual progresiva e indolora en el ojo afectado.

Ambos tipos de melanomas del iris, circunscritos y difusos, presentan un amplio rango de pigmentación, clínica e histopatológicamente. Las lesiones pigmentadas suelen ser fácilmente diagnosticadas como melanomas, pero los tumores amelanóticos pueden ser confundidos con otras lesiones, como leiomioma, tumor metastásico e iridociclitis granulomatosa. Estos tumores amelanóticos pueden aparecer clínicamente translúcidos, de modo que los vasos sanguíneos dilatados del interior del tumor -más prominentes que el componente melanocítico- pueden sugerir erróneamente el diagnóstico de hemangioma; sin embargo, los hemangiomas del iris son extremadamente raros (Ferry, 1972) y algunos autores se cuestionan su existencia (Ferry, 1965). El melanoma “en tapioca” es un raro tumor amelanótico multinodular del iris que puede aparecer tanto en formas localizadas como difusas.

Los melanomas de células epitelioides están compuestos por células que no tienen apenas cohesión. Con este tipo de lesión no es infrecuente que las células sean descamadas desde la superficie del tumor y sembradas por toda la cámara anterior. La siembra tumoral de un melanoma necrótico o epitelioides puede ser visualizada con la lámpara de hendidura como células pigmentadas flotando libremente en el acuoso. Estas células pueden sedimentar en la porción inferior del ángulo y, si este proceso se hace extenso, formar un hipopion oscuro (“black hypopyon”) constituido por un acúmulo de células neoplásicas.

Melanoma del cuerpo ciliar

El melanoma del cuerpo ciliar puede permanecer oculto detrás del iris y alcanzar gran tamaño antes de hacerse evidente. Uno de los signos más precoces consiste en vasos sanguíneos episclerales dilatados en el cuadrante del tumor (vasos “centinela”); éstos sugieren fuertemente la presencia de un tumor subyacente de cuerpo ciliar. Otro signo externo es un foco de pigmentación en el área episcleral, que es característico de la extensión extraescleral de un melanoma de cuerpo ciliar (Demirci et al., 2002b). Deslizando una torunda de algodón sobre estas lesiones la

conjuntiva se desplaza pero los vasos o la pigmentación subyacentes permanecen fijos, confirmando la localización episcleral de esta lesión.

Un interesante hallazgo precoz es una presión intraocular (PIO) descendida en el ojo afectado, comparada con la del ojo contralateral normal; generalmente, hay una diferencia de 4 a 8 mm Hg entre los dos ojos.

Con la pupila dilatada, un melanoma del cuerpo ciliar aparece como una masa ovoide cerca del ecuador del cristalino. En algunos casos, el tumor invade la cámara anterior a través de la raíz del iris; ésta extensión difiere de un melanoma primario del iris en que el estroma del iris está desplazado central y posteriormente y tiene pliegues adyacentes en forma de acordeón, secundarios al tumor del cuerpo ciliar que lo empuja. La mayoría de los melanomas del cuerpo ciliar aparecen clínicamente pigmentados; sin embargo, en el laboratorio de patología, los cortes macroscópicos oscilan desde profundamente pigmentados hasta amelanóticos; por otro lado, muchos de los tumores amelanóticos aparecen pigmentados clínicamente porque el epitelio ciliar pigmentado suprayacente proporciona una apariencia oscura a la superficie de la lesión.

Ocasionalmente, el melanoma del cuerpo ciliar asume un patrón de crecimiento difuso, apareciendo como un engrosamiento irregular que puede extenderse 360 grados en la región ciliar (melanoma “en anillo”). Como los melanomas difusos de la coroides, estos tumores tienen gran tendencia a extenderse extraescleralmente y a metastatizar .

Efectos secundarios en estructuras adyacentes:

Muchos síntomas y signos secundarios a un melanoma del cuerpo ciliar resultan de sus efectos en estructuras adyacentes.

1) Epitelio ciliar: suele ser la primera estructura afectada; la disrupción o separación de esta capa disminuye la capacidad de las células del epitelio no pigmentado de elaborar humor acuoso, pudiendo ser éste el mecanismo que produce la menor PIO observada clínicamente.

2) Cristalino: puede causar astigmatismo, subluxación o catarata. El astigmatismo lenticular puede ser la alteración clínica más precoz; resulta de la compresión del ecuador del cristalino por el tumor, que, al alterar la forma de éste,

causa visión borrosa. Cuando el melanoma del cuerpo ciliar crece puede causar subluxación del cristalino. La catarata es una complicación común; típicamente, comienza como una opacidad cortical en sector en el cuadrante del tumor, progresa a una catarata cortical o nuclear avanzada y, finalmente, origina un cristalino opaco.

3) Vítreo: cuando un melanoma del cuerpo ciliar se eleva creciendo hacia la cavidad vítrea, puede causar hemorragia, siembra de células pigmentadas, o ambas cosas. La hemorragia vítrea es una complicación relativamente rara; el origen puede ser la rotura de un vaso sanguíneo en áreas de necrosis dentro del tumor o de un vaso ciliar suprayacente. El exámen con lámpara de hendidura revela células hemáticas en el área retrolental, aunque en ocasiones el sangrado puede ser tan denso que el melanoma subyacente no sea visible. La siembra de células pigmentadas en el vítreo también puede ocurrir desde un melanoma del cuerpo ciliar. En algunos casos son macrófagos cargados de pigmento y, en otros, son células del melanoma que se han desprendido del tumor.

4) Cámara anterior: estos tumores pueden invadir la cámara anterior a través de la raíz del iris, produciendo una masa sólida en el ángulo iridocorneal e infiltrando difusamente la malla trabecular en un patrón circunferencial u ocasionando un hifema. La primera situación puede llevar a una elevación progresiva de la PIO y culminar en un severo glaucoma secundario. La gonioscopia revela un engrosamiento multinodular de las estructuras del ángulo. El hifema espontáneo puede resultar de la rotura de vasos sanguíneos del círculo arterial mayor del iris, del interior del tumor o, raramente, de áreas de neovascularización del iris (“rubeosis iridis”).

5) Esclera: los melanomas de cuerpo ciliar pueden extenderse a través de la esclera para formar un nódulo extraescleral. Existe la creencia errónea de que el tumor erosiona a través de la esclera, destruyendo gran cantidad de tejido. Por el contrario, el pigmento extraescleral aparece secundariamente a la migración de células tumorales a través de un canal emisario de drenaje del acuoso y a su extensión en la superficie escleral, formando una masa pigmentada epibulbar.

6) Glaucoma secundario: tras causar inicialmente una menor PIO en el ojo afectado, un melanoma del cuerpo ciliar puede producir finalmente una elevación secundaria de ésta. En una revisión de 2.111 melanomas uveales, 96 estaban localizados primariamente en el cuerpo ciliar; de éstos, 16 casos (17%) tuvieron una

elevación secundaria de la PIO (Shields et al. 1987). La causa más frecuente del glaucoma secundario fue la dispersión pigmentaria en el ángulo camerular, y la segunda la invasión directa del mismo por el tumor.

Melanoma de la coroides

Las características macroscópicas del melanoma coroideo dependen del tamaño y localización del tumor, del patrón de crecimiento, del grado de pigmentación y de los efectos en las estructuras adyacentes.

Un melanoma pequeño aparece como un engrosamiento nodular de la coroides, pigmentado y bien delimitado (Li et al., 2000). Al avanzar el crecimiento, muchos tumores atraviesan la membrana de Bruch y asumen una morfología "en champiñón". Pueden aparecer varios patrones de pigmentación en los melanomas coroideos: algunos tumores son intensamente pigmentados, otros son mínimamente pigmentados y otros son parcialmente pigmentados.

El melanoma coroideo difuso crece como un engrosamiento extenso de la coroides; generalmente no se hace muy elevado y puede ser difícil de reconocer oftalmoscópicamente; en estos aspectos puede parecerse a una metástasis coroidea. Produce típicamente un desprendimiento seroso de la retina neurosensorial más extenso que el tipo nodular. Estos tumores suelen presentar características citológicas más malignas, extensión extraescleral y un peor pronóstico sistémico. A diferencia del tipo nodular, el difuso tiene tendencia a invadir la cabeza del nervio óptico y extenderse posteriormente hacia la porción retrolaminar del mismo.

Los melanomas uveales pueden extenderse extraocularmente mediante invasión local hacia el interior del globo afectando retina y vítreo, o, a través de la esclera, hacia la órbita o el nervio óptico. También se extienden mediante diseminación hematógena, localizándose las metástasis más frecuentemente en el hígado (Bomanji et al., 1987).

Efectos secundarios en estructuras adyacentes:

1) Membrana de Bruch: al crecer, el melanoma coroideo puede atravesar la membrana de Bruch y asumir una morfología característica. Inicialmente, el tumor se hernia a través de la rotura y crece dentro del espacio subretiniano, dándole una

configuración en "cuello de botón". El crecimiento en este espacio suele ser más grande que en la coroides y, como la masa en el espacio subretinal llega a hacerse más grande, el tumor desarrolla una forma en "champiñón" o "seta". Esta configuración es posiblemente patognomónica de este tumor .

2) Epitelio pigmentario de la retina (EPR): es importante resaltar que los cambios del EPR que aparecen sobre los melanomas también pueden aparecer sobre nevus grandes sospechosos y no ayudan a diferenciar lesiones benignas de malignas. La atrofia del EPR puede explicar la apariencia moteada que con frecuencia se observa clínicamente y también la hiperfluorescencia puntiforme de la AFG. Histológicamente, el EPR muestra áreas alternantes de acúmulos y ausencia de células pigmentadas. Las drusas son un hallazgo muy común asociado a pequeños melanomas de coroides. Se trata de focos bien delimitados, de color blanco-amarillento y tamaño variable, situados sobre la superficie del tumor a nivel del EPR. Son similares a las drusas que aparecen en la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y probablemente representan depósitos de material en la membrana basal que derivan de fotorreceptores degenerados. Las áreas geográficas de pigmento naranja aparecen en la superficie de muchos melanomas coroides de pequeño o mediano tamaño. Pueden tomar una coloración naranja pálido sobre melanomas intensamente pigmentados y marrón dorado sobre tumores hipomelanóticos (Shields et al., 1980). Histológicamente consisten en acúmulos de macrófagos que contienen lipofucsina y gránulos de melanina derivados de células del EPR degeneradas. Esta alteración se consideró inicialmente como altamente sugestiva de transformación maligna, pero actualmente se reconoce su presencia en diversas lesiones benignas (Shields et al., 1980). Ocasionalmente pueden aparecer desprendimientos del EPR localizados sobre melanomas de coroides y, raras veces, se desarrolla una membrana neovascular corioidea bajo el EPR de un melanoma de coroides. Ésta puede ocasionar hemorragia suprayacente, exudados y, finalmente, una placa de tejido fibroso similar al que se observa en la DMAE avanzada.

3) Retina neurosensorial: las alteraciones de la retina sensorial incluyen degeneración de fotorreceptores, degeneración quística retiniana y retinosquiasis, desprendimiento de retina, e invasión de la retina neurosensorial por el tumor. Los melanomas de coroides tienen tendencia a producir degeneración y desaparición de los fotorreceptores suprayacentes. Posiblemente, esto se debe a que los nutrientes que la

coriocapilar aporta a los fotorreceptores son derivados hacia la coroides para cubrir las necesidades metabólicas del tumor. Histológicamente hay ausencia de fotorreceptores justamente por encima del tumor. La degeneración cistoide retiniana es también un fenómeno precoz sobre muchos melanomas coroideos. Aparece clínicamente como vesículas transparentes de disposición “en panal” sobre la superficie del tumor. Estos espacios quísticos probablemente también ocurren como consecuencia de un déficit nutricional de la retina sensorial. Histológicamente, son espacios claros en la capa plexiforme externa, y cada vesícula está separada de las adyacentes por remanentes de fotorreceptores y células de Müller. La rotura de los remanentes neurales y gliales puede causar una extensa retinosquiasis secundaria. En algunos casos, puede aparecer una maculopatía quística en un ojo con un melanoma periférico. El mecanismo de esta alteración es incierto, pero probablemente esté relacionado con una permeabilidad alterada de los vasos retinianos perifoveales. Con la evolución, el melanoma de coroides origina líquido subretiniano (LSR) suprayacente o adyacente, que puede progresar a un desprendimiento de retina (DR) exudativo total. Histológicamente, el LSR se caracteriza por un material eosinofílico homogéneo entre el EPR y retina neurosensorial. En algunos casos, un tumor coroideo puede extenderse e invadir las capas de la retina neurosensorial. El área afectada presenta la retina engrosada y los vasos sanguíneos ocultos. Histológicamente, se observan las células tumorales reemplazando a las capas de la retina sensorial. Se ha descrito la aparición de anomalías vasculares retinianas relacionadas con un aumento de la isquemia en la retina externa en los tumores con forma de champiñón (Hainsworth et al., 2001). Esta isquemia ocasionaría un aumento del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual motivaría la aparición de neovasos (Boyd et al., 2002)

4) Vítreo: ocasionalmente se produce hemorragia o siembra de células pigmentadas en la cavidad vítrea. La hemorragia puede ocurrir por ruptura de vasos sanguíneos retinianos o por necrosis del propio tumor. Las células tumorales o macrófagos cargados de pigmento liberados en vítreo pueden acumularse en la superficie de la retina y simular una distrofia pigmentaria (“retinosis pigmentaria”).

5) Esclera: la esclera confiere una barrera para la progresión de melanomas malignos uveales. La invasión fuera del ojo usualmente es a través de los canales emisarios, venas vorticosas y arterias y nervios ciliares. Aún así, los melanomas coroideos pueden invadir o extenderse a través de la esclera. Algunos tumores invaden por vía posterior, a menudo a lo largo del trayecto de los nervios perforantes y vasos

hacia el interior de la órbita, o por vía anterior hacia la conjuntiva (Affeldt et al., 1980; Shields y Shields, 1991). La afectación extraescleral que ocurre por vía posterior puede ser difícil de detectar clínicamente, y en algunos casos puede permanecer oculta hasta que el paciente desarrolla proptosis o signos de panoftalmitis (Shields y Shields, 1991).

El tipo infiltrante difuso de melanoma de coroides es una variante poco común (Font et al., 1968), que crece extendiéndose en la coroides sin producir mucho engrosamiento. Éstos son más propensos a invadir a través de la esclera y pueden producir una masa orbitaria mayor que el tumor intraocular. La extensión extraescleral ocurre más frecuentemente en tumores de tipos celulares más malignos, y estadísticamente estos pacientes tienen un peor pronóstico.

6) Nervio óptico: a diferencia del retinoblastoma, que tiene una marcada tendencia a la invasión neural, la mayoría de los melanomas uveales muestran poca inclinación a invadir el nervio óptico; incluso tumores adyacentes al disco óptico tienden a detenerse bruscamente en el margen del mismo. Sin embargo, algunos melanomas difusos peripapilares presentan marcada tendencia a la invasión de la cabeza del nervio óptico, pudiendo simular clínicamente un edema de disco. A diferencia de los retinoblastomas, los melanomas sólo se extienden en la porción retrolaminar del nervio óptico. La siembra de células tumorales en el líquido cerebroespinal ha sido publicada (Sassani et al. 1985), pero no como una causa de muerte. El pronóstico sistémico de los pacientes con melanoma coroideo difuso e invasión del nervio óptico es generalmente malo.

7) Coroides: ocasionalmente aparece degeneración pavimentosa. Se presenta como múltiples focos bien delimitados, de 1 a 2 mm de diámetro, que ocupan la porción del fondo inmediatamente periférica al tumor. Aunque el mecanismo causal es desconocido, presumiblemente es debida a una deprivación en el aporte sanguíneo coroideo en el cuadrante del tumor. Histológicamente, hay una ausencia de coriocapilar con adhesiones entre retina y coroides acompañadas de degeneración de las capas retinianas externas.

8) Cristalino: melanomas de gran tamaño pueden inducir una catarata subcapsular posterior, particularmente si hay un desprendimiento de retina secundario de larga evolución. Tumores más avanzados pueden producir una catarata total.

9) Iris: los melanomas coroideos usualmente no causan alteraciones en el iris. Sin embargo, cuando un tumor se hace grande y produce un DR total, puede ocasionar un abombamiento anterior del iris o una neovascularización del mismo (“rubeosis iridis”). Esta neovascularización probablemente se debe a la isquemia del segmento posterior del globo. Histológicamente hay crecimiento de finos vasos sanguíneos y tejido fibroso en la superficie anterior del iris.

10) Glaucoma secundario: ocasionalmente, los melanomas de la coroides pueden producir una elevación secundaria de la presión intraocular (PIO). En una revisión de 2.111 pacientes con melanoma uveal hubo 1.913 localizados en la coroides; de éstos, 32 (2%) tuvieron elevación secundaria de la PIO. La causa más común fue el glaucoma neovascular y la segunda el cierre angular por desplazamiento anterior del diafragma irido-cristaliniano (Shields et al., 1987).

3.5 Características cito-histopatológicas

En un apartado anterior (véase “clasificación cito-histológica”, en “2/Tumores melanocíticos del tracto uveal”) ya fueron comentados los aspectos referidos a los tipos celulares en el melanoma uveal, así como la inicial clasificación de Callender (en 1931) y las modificaciones más notorias de la misma.

Hallazgos inmunohistoquímicos

-Marcadores de diferenciación

Intentando caracterizar los melanomas uveales mediante anticuerpos monoclonales, inicialmente se utilizaron algunos de reconocida actividad frente a los melanomas cutáneos (Bomanji et al., 1987). De todos los anticuerpos monoclonales específicos frente al melanoma cutáneo el que pareció tener una mayor especificidad frente al de úvea era el *NKI/BETEB* (Rajpal et al., 1983).

Más tarde, en un estudio (Wang et al. 1992) fue identificado un antígeno asociado al melanoma uveal: el anticuerpo monoclonal *8-IH*. La secuencia de aminoácidos era idéntica a la del antígeno asociado al melanoma cutáneo. Este último hallazgo confirmó el hecho sugerido en otros estudios previos en los que se señalaba que antígenos comunes entre melanomas cutáneos y uveales.

Por otro lado, como las células de los tumores uveales melanocíticos son derivadas de la cresta neural, sería de esperar que los tumores derivados de ellas tuvieran la *proteína S-100* (Kan-Mitchell et al., 1990). Y así, Jones y Kane (1996), en un intento de conocer hasta qué punto los melanomas coroideos son inmunofenotípicamente idénticos a los cutáneos, emplearon la fracción policlonal de S-100, constituida por una mezcla de polipéptidos presentes en un gran número de células normales y neoplásicas. Los autores encontraron grandes diferencias entre uno y otro tipo de melanoma.

El anticuerpo monoclonal *HMB-45* es una proteína obtenida del melanoma maligno cutáneo y es un marcador de agresividad (malignidad) en las mismas, siendo muy útil en la diferenciación entre nevus atípicos y melanomas; por ello, se aplicó también al estudio de las proliferaciones melanocíticas uveales. Y así, Sterhl et al. (1993) valoraron la tinción con el AcMc HMB-45 en tumores oculares melanóticos y amelanóticos, intentando distinguir entre melanocitos benignos y malignos; a su vez, compararon la actividad de este AcMc con la del S-100. Las lesiones melanocíticas se marcaron con el HMB-45 aunque menos que con el S-100, pero no fue posible distinguir claramente entre melanocitos benignos y malignos.

La *enolasa neuronal específica* es una enzima que se encuentra en las neuronas, pero una gran variedad de células no neuronales también pueden expresar la enolasa neuronal específica en diferentes grados.

Burnier et al (1991) compararon la reactividad inmunohistoquímica de 13 nevus uveales y 20 melanomas uveales para HMB-45, proteína S-100 y enolasa neuronal específica de muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina. Todas las lesiones fueron positivas para HMB-45. Las tasas de falsos negativos para la proteína S-100 y la enolasa neuronal específica fueron del 21 y 18%, respectivamente. Si sólo se consideran las reacciones altamente positivas, más de la mitad de los tumores deberían ser considerados como negativos para la proteína S-100 y la enolasa

neuronal específica. Los nevus se teñían con menos intensidad que los melanomas con estos tres anticuerpos. La expresión del HMB-45 parecía ser mayor en nevus “activos” (con más atipia/pleomorfismo nuclear y actividad divisional) que en los menos activos o “inactivos” (quiescentes).

-Marcadores de proliferación

El antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*) es una proteína auxiliar relacionada con la ADN- δ -polimerasa que es expresada intensamente por las células en división; en consecuencia, se ha demostrado la relación entre la expresión de PCNA y la fracción de crecimiento, con niveles crecientes durante la fase G1 del ciclo y decrecientes durante las fases G2 y M. Algunos estudios han indicado que la detección del PCNA en cortes incluidos en parafina de melanoma uveal está relacionada con el tiempo de supervivencia de los pacientes que no fueron curados (Walton et al., 1993).

El anticuerpo monoclonal *Ki-67* identifica un antígeno nuclear que es expresado en células proliferantes: es decir, aquellas que se encuentran en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular, pero no en las células en fase de reposo (G0). El epitopo reconocido por el AcMc *Ki-67* es muy lábil, siendo sólo fiable su detección en cortes de congelación o en muestras citológicas. Mooy et al. (1990) ensayan el AcMc *Ki-67* y, aunque el objetivo de su trabajo era establecer un valor pronóstico de los melanomas en función de esta técnica, no fue posible demostrar una correlación entre el grado de inmunotinción frente a *Ki-67* y la supervivencia de los pacientes. Actualmente se puede marcar la molécula *Ki-67* en el material tisular incluido en parafina mediante el *MIB-1*, tras recuperación antigénica (p.e., con microondas, olla a presión...), constituyendo el mejor marcador inmunohistoquímico de proliferación celular; sin embargo, no se han realizado aún estudios importantes respecto a la supervivencia en el melanoma uveal.

-Otros marcadores inmunohistoquímicos

Otro antígeno que puede ser detectado en cortes incluidos en parafina es el producto anormal del gen mutante *p53*. El *p53* es un oncogén recesivo y la expresión del producto anormal del gen ha sido detectada en algunos melanomas uveales

(Miyashita y Reed, 1993), aunque el significado pronóstico de esta expresión es desconocido.

3.6 Diagnóstico

Melanomas del iris (Fig. 1)

El diagnóstico del melanoma de iris es realizado mediante una historia detallada y objetivando los hallazgos clínicos mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura, gonioscopia y examen ocular completo.

Algunas pruebas complementarias aportan información diagnóstica adicional. La fotografía con lámpara de hendidura puede proporcionar una mejor evaluación de la lesión. La angiografía fluoresceínica (AFG) puede ser útil en demostrar la vascularización de la lesión, pero no es diagnóstica. La ultrasonografía tradicional (empleando una técnica de inmersión) es de poco valor, porque la resolución de las estructuras de la cámara anterior es escasa. Recientemente, un nuevo método de ecografía en modo B, llamado biomicroscopía ultrasónica, ha sido desarrollado para evaluar el segmento anterior; utiliza frecuencias elevadas, entre 50 y 100 MHz, y proporciona una elevada resolución en estructuras y lesiones del segmento anterior (Byrne y Green, 1992). En algunos casos, la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) puede ser de utilidad en el diagnóstico de un melanoma de iris, pero no debería ser empleada a menos que los resultados vayan a influenciar la decisión terapéutica. Es importante tener en mente que la PAAF tiene limitaciones concretas; p.e., puede ser difícil diferenciar un nevus de células fusiformes de un melanoma de células fusiformes de bajo grado. Sin embargo, las células epitelioides suelen ser más fácilmente reconocibles. En el caso de lesiones densamente pigmentadas, es importante realizar preparaciones blanqueadas del aspirado para estudiar detalles celulares con más exactitud (Greene y Fraumeni, 1979).

Probablemente el mejor criterio diagnóstico para un melanoma de iris sea la evidencia de crecimiento. La documentación fotográfica del incremento de tamaño de una lesión melanocítica debe hacer sospechar el diagnóstico de melanoma maligno. En

definitiva, con lámpara de hendidura, gonioscopia y fotografías seriadas, el oftalmólogo puede documentar el tamaño y crecimiento del tumor sin biopsia.

Melanomas de úvea posterior (Figs. 1-7)

El diagnóstico de los melanomas de coroides comienza con su detección gracias a la exploración del fondo de ojo con el oftalmoscopio binocular indirecto, que es la técnica más importante en ojos con medios transparentes. En ojos con medios opacos, el problema es más complejo y se deben emplear determinadas pruebas complementarias para llegar a un diagnóstico exacto (Shields et al., 1987). Aún así, sigue existiendo controversia respecto a los métodos más fiables en el diagnóstico clínico de esta patología (Shields et al., 1993).

-Historia clínica

Ante un paciente con un presunto melanoma uveal se debe realizar una historia clínica detallada, recogiendo cualquier antecedente familiar de enfermedad ocular o cáncer. El enfermo también debe ser interrogado acerca de cualquier historia pasada o actual de enfermedad sistémica, neoplasias, intervenciones quirúrgicas o problemas oculares. Debe investigarse la posible existencia de hipertensión arterial, diabetes mellitus, vasculitis sistémica por colagenosis, cirugía reciente de catarata o glaucoma y DMAE, para valorar el diagnóstico diferencial con otras entidades. Los síntomas clínicos que suelen referir son pérdida de agudeza visual (AV), fotopsias, miodesopsias o , cuando se acompaña de un DR exudativo, alteraciones del campo visual; el dolor no es un síntoma propio de melanoma, pero puede presentarse en casos avanzados cuando existe glaucoma o inflamación.

-Evaluación sistémica

En todos los pacientes debe efectuarse un examen sistémico completo para excluir la posibilidad de una metástasis uveal de otro tumor o para detectar metástasis a distancia del melanoma uveal primario. La evaluación sistémica inicial y los estudios de seguimiento subsecuentes están dirigidos a las localizaciones más frecuentes de diseminación de la enfermedad. El hígado es la localización predominante de las

metástasis clínicas (71.4%) y suele ser también el órgano inicialmente afectado (45.7%). Otras localizaciones frecuentes incluyen: pulmón (40.0%), tejido subcutáneo (34.3%) y hueso (17.1 %). El examen, por tanto, debe incluir una exploración física completa, con atención a la piel y tejidos subcutáneos, estudios séricos de función hepática y una radiografía de tórax (Gragoudas et al., 1988; Shields et al., 1993; Wijsman et al., 1993).

Los estudios de función hepática deben ser realizados rutinariamente. Los niveles séricos de lactato dehidrogenasa plasmática (LDH), transaminasa glutámico oxalacética sérica (SGOT), gamma-glutamyl-transpeptidasa sérica (SGGT o γ -GT) y fosfatasa alcalina pueden ser útiles en la detección de metástasis hepáticas iniciales. La determinación de γ -GT sérica parece ser el test más sensible. Si estas enzimas estuvieran elevadas, estaría indicado un estudio por imagen hepático, realizando ecografía o tomografía computarizada (TAC) abdominal y resonancia nuclear magnética (RNM) del hígado.

De todos modos, en la mayoría de los pacientes todas estas pruebas suelen ser negativas en el momento del diagnóstico del tumor primario (Shields et al., 1993). Aunque un pequeño porcentaje de pacientes (1%) se presentan simultáneamente con melanoma uveal primario y metastásico, un amplio número tienen enfermedad microscópica en cualquier localización, que el clínico es incapaz de detectar con las modalidades diagnósticas actualmente disponibles (Gragoudas et al 1998).

-Examen oftalmológico

a) Examen del ojo contralateral. El melanoma uveal primario es casi siempre unilateral. Ya que diversas lesiones que pueden simular un melanoma suelen ser bilaterales, como la retinosquiasis degenerativa y la DMAE, un examen cuidadoso del ojo contralateral es obligatorio. A veces, alteraciones en el ojo adelfo (p.e. una mala visión por una retinopatía diabética severa) pueden influir en el manejo terapéutico (Shields et al., 1993).

b) Examen ocular externo. Los vasos episclerales dilatados (“vasos centinela”) y la evidencia de melanocitosis ocular hace sospechar que una masa intraocular sea probablemente un melanoma (Shields et al., 1993).

c) Biomicroscopía (BMC) con lámpara de hendidura (LH). Un abombamiento del iris, un cristalino subluxado o una catarata cortical en sector, pueden ser signos de un melanoma de cuerpo ciliar. Melanomas de tipo necrótico o que invaden la retina pueden ocasionar siembra celular en el vítreo anterior detectable mediante BMC con LH.

d) Oftalmoscopia indirecta. Es el procedimiento más importante y que más información proporciona en la evaluación de una masa de fondo de ojo sospechosa de ser un melanoma. El exámen con el oftalmoscopio binocular indirecto debe ser completado con un estudio BMC con LH y lentes indirectas de no contacto (de +90 ó +78 dioptrías) o lentes de contacto de fondo (lente de Goldmann de 3 espejos), que permitan apreciar detalles subclínicos como pigmento naranja, degeneración cistoide retiniana o pequeñas cantidades de LSR. Según algunos autores, más del 95% de los melanomas de coroides pueden ser diagnosticados mediante oftalmoscopia binocular (Shields et al., 1993).

e) Gonioscopia. La lente de contacto de tres espejos permite detectar la extensión más anterior del tumor a nivel de cuerpo ciliar o ángulo iridocorneal .

f) Transiluminación. Mediante la iluminación transpupilar o transescleral los tumores hiperpigmentados y las hemorragias proyectan una sombra, mientras que los desprendimientos de retina, desprendimientos coroides serosos y tumores no pigmentados permiten la transmisión de la luz. No se usa rutinariamente como método diagnóstico, pero es esencial para localizar y determinar las dimensiones basales del tumor cuando va a ser tratado mediante resección local o radioterapia.

g) Fotografía de fondo de ojo. La comparación de fotografías seriadas permite detectar y documentar incluso un crecimiento mínimo o subclínico de lesiones manejadas mediante observación periódica, como nevus y melanomas de pequeño tamaño.

h) Angiografía fluoresceínica (AFG). Aunque el melanoma de coroides no muestra un patrón patognomónico, puede ser de utilidad para diferenciarlo de ciertos pseudomelanomas, como hemorragias subretinianas o intrarretinianas (Shields et al., 1993); sin embargo, en muchos casos no lo diferencia de un nevus sospechoso, un carcinoma metastásico o un hemangioma de coroides. El patrón angiográfico del

melanoma de coroides varía con el tamaño, pigmentación y efecto en estructuras adyacentes, particularmente el EPR. De forma general, estos tumores muestran hiperfluorescencia de los vasos intralesionales en la fase arterial o venosa precoz, progresiva hiperfluorescencia en las fases venosa tardía y de recirculación, e hiperfluorescencia tardía por tinción de la masa tumoral. Además, dependiendo del tamaño tumoral se observan diversos matices:

÷ Los tumores muy pequeños pueden ser imposibles de diferenciar de otras lesiones pigmentadas y no presentar ninguna anomalía en la AFG a causa de un EPR intacto.

÷ Un melanoma algo más grande tiene en las fases precoces una hiperfluorescencia moteada por la atrofia del EPR, junto con áreas hipofluorescentes por el pigmento naranja. Al avanzar el angiograma, los focos puntiformes permanecen y suele haber tinción tardía del LSR adyacente o suprayacente.

÷ Los melanomas de gran tamaño, particularmente aquellos que han atravesado la membrana de Bruch (morfología “en champiñón”), muestran la clásica "doble circulación": durante las fases iniciales los vasos coroideos del tumor presentan hiperfluorescencia por la presencia de contraste en su interior; la fluorescencia simultánea de vasos coroideos y retinianos es extremadamente característica de estos melanomas. En fases más avanzadas hay extravasación de colorante y progresivos puntos hiperfluorescentes; en tiempos tardíos se observa la hipofluorescencia de los grandes vasos que contrasta con la hiperfluorescencia de fondo por tinción tisular.

i) Ecografía. Se ha convertido en la técnica complementaria más importante en el examen ocular cuando se sospecha la existencia de un melanoma de coroides o cuerpo ciliar. El COMS (Collaborative Ocular Melanoma Study, 1990) considera la ecografía como el método más útil de diagnóstico después de la oftalmoscopia. No sólo es imprescindible en ojos con opacidad de medios (Shields et al., 1987), sino que, además, en ojos con medios transparentes aporta información de gran rendimiento clínico:

- Identifica el tumor y diferencia el melanoma maligno de lesiones simuladoras, en aproximadamente el 96% de los casos.
- Caracteriza tamaño, forma y localización tumoral.
- Determina las medidas del tumor,

- En la estadificación inicial: para documentar medidas iniciales.
- En el seguimiento: para indicar el tratamiento en casos manejado mediante observación (crecimiento documentado), y para valorar la regresión o el crecimiento después del tratamiento conservador.

Las unidades ecográficas habituales, con una frecuencia de ultrasonidos entre 7.5 y 10 MHz, incorporan dos modalidades A y B (Shields et al., 1993). La ecografía en modo A (un modo de visualización de la amplitud o intensidad del eco respecto al tiempo) informa sobre la reflectividad interna y los movimientos vasculares espontáneos dentro del tumor; el modo B (la intensidad de un eco o señal es representada por la luminosidad en el punto correspondiente) aporta información topográfica bidimensional y la correlaciona con el patrón morfológico y dimensiones del tumor. Ambas modalidades muestran unos patrones acústicos muy característicos del melanoma de coroides:

-La ecografía en modo A presenta un patrón tumoral sólido, con ecos iniciales de elevada amplitud, una reflectividad interna baja (como consecuencia de su arquitectura histológica homogénea), un descenso en la amplitud de los ecos en el interior de la masa cuya representación gráfica es una pendiente denominada ángulo Kappa, un eco prominente en la base de la lesión correspondiente a la esclera y en la mayoría de los casos también pueden ser demostradas pulsaciones vasculares espontáneas reflejo del flujo vascular interno. Este último estudio ha caído en desuso por el empleo de la ecografía doppler color, con la que es posible cuantificar mejor el flujo sanguíneo intratumoral (Wilson y Fraunfelder, 1978).

-La ecografía en modo B muestra una masa coroidea cupuliforme o en forma de champiñón, un borde anterior elevadamente reflectivo, silencio acústico en el interior del tumor (que refleja la atenuación de los ultrasonidos a través del mismo), excavación coroidea y sombra orbitaria. El estudio de la interfase esclera-órbita se ha mostrado útil, pero no siempre exacto en la detección de una posible extensión extraescleral.

Las *nuevas tecnologías en los ultrasonidos diagnósticos* incrementan la información ultrasonográfica, gracias a una mejor instrumentación y a las técnicas de digitalización en el procesado de la imagen (Coleman, 1994).

-La ecografía doppler color (EDC) ofrece un método no invasivo para cuantificar el flujo sanguíneo "in vivo". Varios estudios han demostrado flujo sanguíneo en tumores intraoculares empleando EDC (Byrne y Green, 1992; Levine y Broach, 1995).

-Ultrasonidos de alta frecuencia (50-100 MHz). Las frecuencias más elevadas aportan una excepcional resolución en las patologías del segmento anterior (aportan mayor detalle con menor penetración). En iris y cuerpo ciliar permiten identificar tumores de pequeño tamaño, diferenciar quistes de tumores sólidos y demostrar canales vasculares.

-Ultrasonidos en imagen tridimensional (3-D). La digitalización permite obtener imágenes secuenciales y mostrarlas en una representación gráfica tridimensional (Coleman, 1991; Kusumano et al., 1998). La presentación en 3-D realza la perspectiva haciendo el diagnóstico más fiable y permitiendo: 1) medidas exactas del volumen tumoral y 2) localización espacial y concentración acústica en la lesión.

- Caracterización tisular mediante US: Coleman et al. (1990) han desarrollado un método que denominan "tipificación tisular acústica" que permite una valoración histológica "in vivo" y una sub-clasificación de los tipos de melanomas. La sub-clasificación puede ser Tipo B, que se correlaciona con la de Callender en el 75-80% de los casos, y Tipo E, que relaciona subclases tumorales con asas y redes vasculares (Shields, 1994).

j) Tomografía computarizada (TAC). Permite valorar tamaño y configuración en tumores de más de 3 mm de elevación y demostrar nódulos de extensión extraescleral en casos de melanoma uveal posterior. Aunque es una técnica prometedora, actualmente no parece tener ventajas frente a la ultrasonografía en la estimación del tamaño y en el diagnóstico diferencial.

k) Resonancia nuclear magnética (RNM). Esta técnica permite obtener excelentes imágenes axiales, coronales y sagitales de los globos oculares y estructuras adyacentes; resulta muy útil en tumores que tienen más de 3 mm de elevación. Las características de las lesiones melanocíticas en la RNM dependen de las propiedades paramagnéticas de la melanina; la mayoría de los melanomas uveales aparecen

hiperintensos (con respecto a la señal del vítreo) en las imágenes en T1 e hipointensos en T2. El empleo de agentes de contraste (como el gadolinio) mejoran la resolución de la imagen tumoral y permiten la diferenciación de éste frente al líquido subretiniano. La extensión extraocular (invasión escleral, extensión al nervio óptico y órbita) del melanoma uveal posterior puede ser caracterizada en tamaño y extensión (Recsan et al., 2002).

l) Test de captación de fósforo radiactivo (P^{32}). Es una técnica raramente empleada en la actualidad. Se basa en la observación de que tejidos metabólicamente activos, como las neoplasias, generalmente captan y retienen más fósforo radiactivo que los tejidos no neoplásicos. El empleo combinado de la ultrasonografía y el test P^{32} es un abordaje útil para diagnosticar un melanoma uveal cuando el fondo no puede ser visualizado (Shields et al., 1987).

m) Biopsia intraocular. Esta técnica, en cualquiera de sus variantes, no está justificada cuando el diagnóstico puede realizarse empleando métodos menos agresivos. Debe ser reservada para casos en los que el diagnóstico es difícil y en los que la decisión terapéutica dependerá de los hallazgos citológicos (Shields et al., 1993).

-Biopsia por punción-aspiración con aguja fina (PAAF): la PAAF transocular con estudio citológico del aspirado puede ser útil en casos seleccionados. Los estudios inmunohistoquímicos y citomorfométricos permiten diagnosticar y establecer un pronóstico del supuesto melanoma (Folberg et al., 1993). La diseminación tumoral en el trayecto de la aguja es posible en casos de retinoblastoma, que es un tumor muy friable; sin embargo, en los melanomas la técnica parece ser relativamente segura. En los melanomas localizados anteriormente es posible un acceso transescleral. En los de polo posterior es necesario un abordaje a través de la pars plana, haciendo vitrectomía (VPP), o bien sin vitrectomía visualizando la punta de la aguja mediante oftalmoscopia indirecta (Sahel y Albert, 1994; Eide et al., 2001).

-Biopsia incisional: hay circunstancias en las que la biopsia incisional de un tumor intraocular puede estar justificada con propósito diagnóstico. En tumores

localizados posteriormente se realiza un abordaje transvítreo mediante VPP. En los situados anteriormente es posible hacerlo vía transescleral, tallando un tapete escleral del 80% de espesor y realizando una biopsia en su lecho. El peligro potencial de siembra de células tumorales en los tejidos extraoculares con este método aún no está aclarado.

n) Perimetría. Tanto lesiones benignas como malignas pueden producir escotomas absolutos o relativos por lo que el examen del campo visual no es útil en la evaluación de un tumor intraocular.

ñ) Diagnóstico inmunológico

Las técnicas inmunológicas, aún en desarrollo, parecen prometedoras en el diagnóstico del melanoma uveal primario y de sus metástasis.

-Hallazgos inmunohistoquímicos (IHQ): Anticuerpos monoclonales.

Las técnicas inmunohistoquímicas, basadas en el empleo de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico del melanoma de úvea, son relativamente recientes. Los anticuerpos monoclonales constituyen un excelente reactivo por su alta especificidad, reconociendo un único determinante antigénico (epitopo) en una molécula. Diversos estudios han documentado la presencia de antígenos asociados al melanoma (AAM), tanto en tumores uveales primarios (Donoso et al., 1985; Donoso et al., 1986) como en focos metastásicos (Donoso et al., 1985). Algunos de estos estudios indican la presencia de un antígeno elevadamente glicosilado en un elevado porcentaje de melanomas uveales.

El empleo de las técnicas inmunohistoquímicas podría mostrarse útil en la diferenciación entre nevus y melanomas uveales y en el análisis de la supervivencia de los pacientes tras la enucleación.

-Inmunoescintigrafía (gammagrafía)

Esta técnica consiste en la inyección a pacientes con sospecha de melanoma uveal de fragmentos de anticuerpos monoclonales (concretamente el MoAb 225.285), marcados con sustancias radiactivas (tecnecio⁹⁹ metaestable, Tc⁹⁹), pudiendo

reproducir la imagen del tumor en una gammacámara (Bomanji et al., 1987). Schaling et al. (1991) han probado la inyección del AcMc HMW-MAA. Aunque este anticuerpo monoclonal se expresa "in vitro" en los melanomas oculares, su aplicación en la inmunoescintigrafía es todavía incierta. Bomanji et al. (1987) estudiaron 10 pacientes con melanoma uveal y en 5 de ellos que presentaban un melanoma uveal típico la inmunoescintigrafía fue positiva. Esta técnica se ha perfeccionado en los últimos años; Scheidler et al. (1992) han conseguido éxitos diagnósticos en el 78% de los casos. En el futuro estas técnicas pueden mostrarse aún más útiles en el diagnóstico y control de pacientes con melanoma uveal.

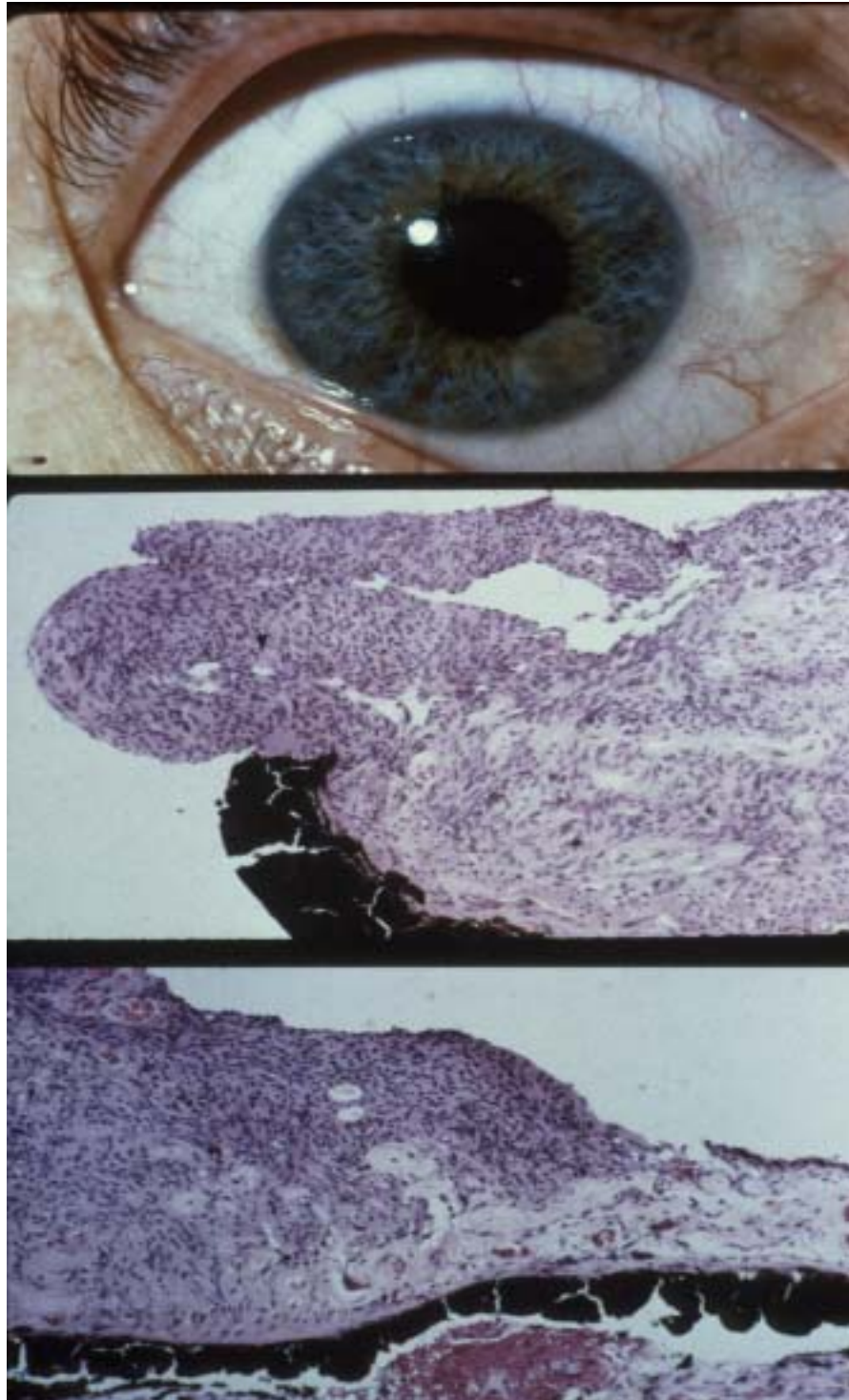


Fig. 1.- Melanoma del iris: aspectos clínico e histológico



Fig. 2.- Melanoma de coroides: imagen clínica

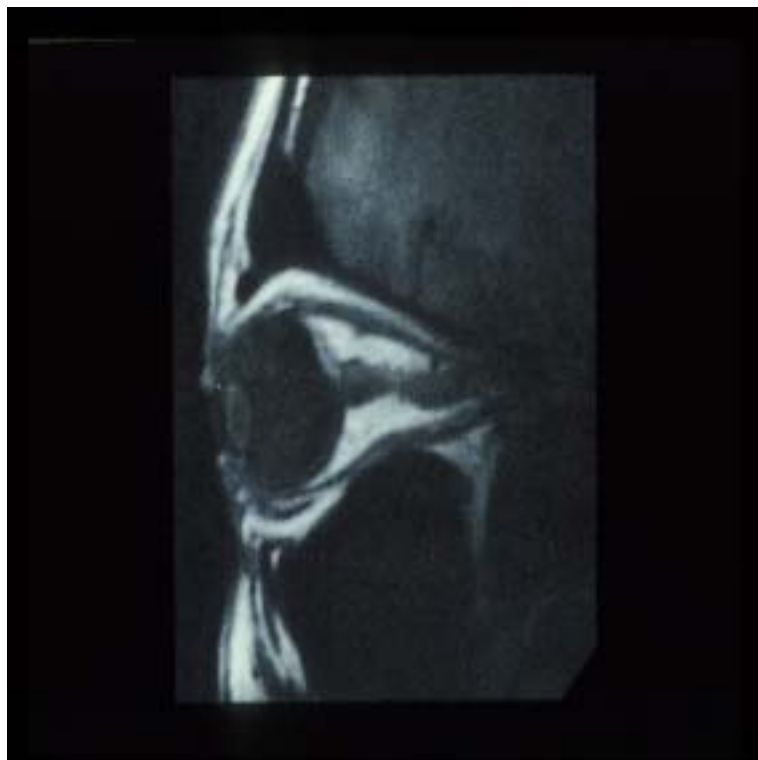


Fig. 3.- Melanoma de coroides: resonancia magnética.

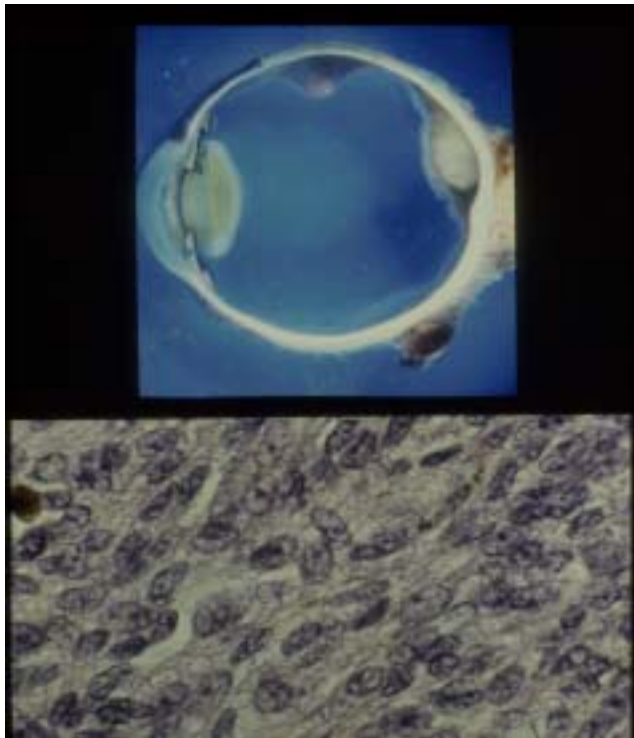


Fig. 4.- Melanoma de coroides: aspecto macroscópico y microscópico (tipo fusocelular)

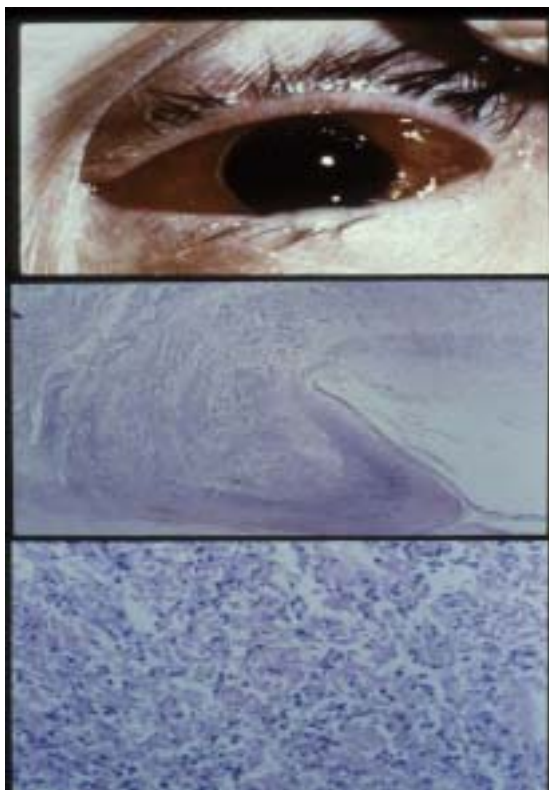


Fig. 5.- Melanoma de coroides: imagen clínica e histológica (necrosis masiva)

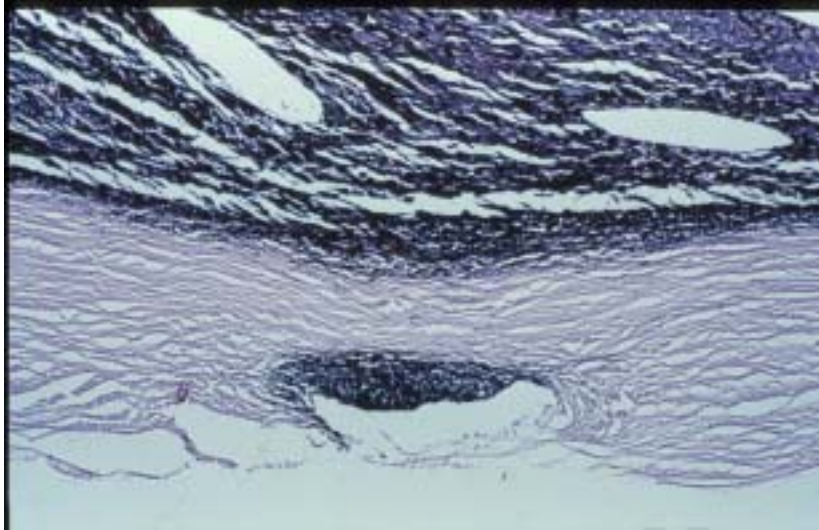


Fig. 6.- Invasión venosa (vortex)



Fig. 7.- Extensión extracapsular

3. 7 Tratamiento

Melanomas del iris

Con un mejor conocimiento del comportamiento clínico de los melanomas de iris, el tratamiento ha pasado a ser más conservador. Gradualmente ha llegado a ser aceptado que los melanomas de iris circunscritos ofrecen un pronóstico mucho mejor de lo que previamente se consideraba, y que la iridectomía quirúrgica en sector es frecuentemente curativa (Zimmerman, 1986). Melanomas de iris circunscritos que se extienden posteriormente hacia el cuerpo ciliar son tratados habitualmente mediante iridociclectomía o modificaciones de ese procedimiento. En los últimos años, ha habido una progresiva tendencia a controlar muchos melanomas de iris mediante observación periódica en lugar de intervención quirúrgica. Un estudio de 175 casos mostró que sólo alrededor del 5% de lesiones melanocíticas de iris sospechosas no tratadas presentaron evidencia de crecimiento durante los primeros 5 años tras su detección (Territo et al., 1988). Así, pues, la mayoría de lesiones melanocíticas circunscritas del iris no requieren extirpación quirúrgica inmediata.

En definitiva, la actitud clínica apropiada varía dependiendo de si el tumor es circunscrito o difuso (Geisse y Robertson, 1985; Shields et al., 1983). Las opciones de tratamiento incluyen:

1) No tratamiento, con cuidadosa *observación*, incluyendo fotografías seriadas (en pacientes asintomáticos con lesiones estables).

2) Con crecimiento documentado, *cirugía excisional*: iridectomía, si el tumor está restringido al iris; iridotrabeculectomía o iridociclectomía, cuando el tumor se extiende hacia el cuerpo ciliar (Memmen y McLean, 1990).

3) *Enucleación*, en algunos pacientes con afectación difusa del iris, afectación de más de la mitad del iris y ángulo de la cámara anterior y crecimiento documentado, afectación extensa del iris y glaucoma intratable, tumores grandes irresecables y/o extensión extraocular, así como en tumores en ojos sin visión salvable.

1. Generalidades. Controversia respecto a la enucleación:

El manejo de los melanomas de la úvea posterior ha sido objeto de considerable controversia. La enucleación, tradicionalmente el principal tratamiento de estos tumores, ha llegado a ser cuestionada (McLean et al., 1980; Shields et al., 1991; Zimmerman et al., 1980) y, en consecuencia, otras opciones terapéuticas han sido empleadas en los últimos años (Robertson, 1989; Shields et al., 1993; Shields y Shields, 1992). La base de la controversia radica en dos factores: 1º) la limitada cantidad de datos disponibles respecto a la historia natural del tumor en pacientes no tratados y 2º) la ausencia de un número suficiente de pacientes, agrupados y contrastados, según factores de riesgo conocidos y no-conocidos y tratados mediante diferentes técnicas para comparar su eficacia. La terapia con radiación se ha visto tan efectiva como la enucleación (Augsburger et al., 1990; Seddon et al., 1990) y fué evaluada como una alternativa a la enucleación en un ensayo clínico prospectivo randomizado del COMS (Earle et al., 1987; Nakamura et al., 1996; Straatsma et al., 1988).

La mayoría de los melanomas uveales se tratan rápidamente una vez diagnosticados. Gallagher et al. (1988) encontraron que, en un 47% de los pacientes, el tratamiento fue iniciado cuatro o más meses después de la presentación, pero en la mitad de estos casos el retraso fue intencionado, ya que eran pacientes con tumores pequeños que fueron observados para que el crecimiento apoyara el diagnóstico de melanoma maligno. A diferencia del retinoblastoma, el retraso en el tratamiento del melanoma uveal no empeora la supervivencia (Gass, 1980).

÷Metástasis tras la enucleación:

La detección de metástasis es poco frecuente en el momento de la enucleación u otro tipo de tratamiento, pero los datos de supervivencia de pacientes con melanoma de úvea posterior manejados con enucleación indican que la tasa de mortalidad por melanoma metastásico alcanza un máximo en los 2-3 primeros años tras la cirugía. La ausencia de datos de pacientes sin tratar con melanoma de úvea posterior hace que el significado exacto de esta observación no esté claro.

Han sido ofrecidas varias explicaciones para la aparente relación entre la enucleación y la elevada tasa de mortalidad relacionada con el tumor durante el intervalo de los 2-3 años postenucleación, incluyendo las siguientes:

a) La enucleación disemina células tumorales y acelera la enfermedad metastásica ("Hipótesis de Zimmerman") (Zimmerman et al., 1978; Zimmerman et al., 1979; Zimmerman et al., 1980).

b) La creciente tasa de mortalidad tras la enucleación refleja el potencial maligno de los tumores en el momento del tratamiento y no está causalmente relacionada con la enucleación en sí.

c) La eliminación del tumor primario altera los mecanismos de defensa del huésped y desenmascara la enfermedad metastásica subclínica pre-existente.

Apoyándose en la primera de las explicaciones, la "hipótesis de Zimmerman", que postula que el trauma quirúrgico podría promover la diseminación de las células tumorales (Niederhorn, 1984; Wilson y Fraunfelder, 1978; Zimmerman, 1986), algunos investigadores han cuestionado la eficacia de la enucleación e incluso han planteado que la enucleación puede causar o estimular las metástasis (McLean et al., 1982; Niederhorn, 1984; Wilson y Fraunfelder, 1978; Zimmerman et al., 1978). La terapia con radiación se ha visto tan efectiva como la enucleación (Augsburger y Gamel, 1990; Seddon et al., 1990) y está siendo evaluada actualmente como una alternativa a ésta en un ensayo clínico prospectivo "randomizado" (Nakamura et al., 1996; Straatsma et al., 1988).

Otros autores, sin embargo, argumentan que otro tratamiento que no sea la enucleación raramente puede estar justificado en el melanoma maligno uveal (Manschot y van Strik, 1987; Manschot y van Strik, 1992; Seigel et al., 1979).

÷Metástasis subclínicas:

a) Concepto: influencia en la evolución y pronóstico. Uno de los asuntos aún sin resolver respecto a la enucleación está relacionado con el concepto de la enfermedad metastásica subclínica en el momento del diagnóstico del tumor primario (Wang et al., 1993). Aproximadamente, el 40% de los pacientes con melanoma uveal tratados con enucleación mueren en un plazo de 10 años de enfermedad metastásica, generalmente localizada en el hígado (Zimmerman et al., 1980). A pesar de esto, la

evidencia clínica de enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico del tumor primario es rara, siendo detectada en sólo 1-2% de los pacientes usando métodos convencionales (Shields et al., 1991). Estos datos y diversas investigaciones al respecto sugieren que la enfermedad metastásica subclínica puede ser más común de lo que se sospecha actualmente (Donoso et al., 1985; Donoso et al., 1986; Gherardi et al., 1985). Estas metástasis podrían permanecer en estado de inactividad durante años, manteniéndose bajo control por los mecanismos de defensa del huésped. Basándose en estos hallazgos, la detección precoz de enfermedad metastásica en pacientes con melanoma uveal podría mejorar el manejo clínico de este proceso e incrementar nuestro conocimiento sobre su historia natural y los mecanismos de tumorigénesis y metástasis.

b) Características biológicas de las metástasis del melanoma de úvea. La patogénesis de las metástasis tumorales constituye un complejo fenómeno biológico. El desarrollo de metástasis clínicas depende de una constante interrelación entre las propiedades de las células tumorales y el huésped. Éstas aparecen cuando ciertas células tumorales evaden o superan los mecanismos de defensa del huésped o incluso los utilizan en su propio beneficio (Fidler et al., 1978).

Es posible que las manipulaciones quirúrgicas puedan diseminar células tumorales en la circulación. Los melanomas uveales tienen tendencia a la diseminación hematógena, y la elevada vascularización de la coroides junto con la ausencia de canales linfáticos puede explicar en parte este fenómeno; en exámenes histológicos se ha demostrado invasión de los canales vasculares por células del melanoma. Además, ha sido publicado que la enucleación podría alterar los mecanismos inmunológicos del huésped y así incrementar la posibilidad de metástasis (Nieder Korn, 1984). A pesar de la ausencia de una bien documentada diseminación de células tumorales secundaria a la cirugía y de que aún no está claro el significado pronóstico de la presencia de estas células en la circulación, se considera que el trauma quirúrgico debería ser minimizado para limitar la posibilidad de diseminación hematógena (Shields y Shields, 1992).

Ya que el número de células de melanoma circulantes se piensa que es bajo, sería interesante la detección exacta de estas células en la circulación, particularmente el perfil temporal de la concentración celular durante y después de la cirugía.

c) Diagnóstico de metástasis subclínicas. Las técnicas con *anticuerpos monoclonales* (AcMs) pueden tener un futuro papel en la valoración exacta de la masa tumoral. En otro tipo de cánceres, como el carcinoma de mama, los AcMs han sido empleados para detectar metástasis subclínicas donde otras técnicas convencionales han fallado. Los AcMs anti-idiotipo también han sido empleados para monitorizar la presencia de células tumorales en un paciente con linfoma antes de que la recidiva fuese clínicamente aparente.

En el melanoma uveal podría ser factible emplear AcMs para diagnosticar metástasis subclínicas. Recientemente han sido desarrollados dos AcMs, Mab8-1H y ME491, que se unen a un antígeno asociado al melanoma (AAM) elevadamente glicosilado presente en melanomas uveales (Donoso et al., 1985; Donoso et al., 1986) y cutáneos (Atkinson, 1984). Estos AcMs fueron usados en un estudio para determinar los niveles del AAM en suero de pacientes tratados por melanoma de úvea posterior que subsecuentemente desarrollaron metástasis sistémicas. Fueron observadas elevaciones significativas de los niveles séricos de AAM en pacientes con melanoma metastásico documentado al compararlos con los de pacientes sin metástasis documentadas (Donoso et al., 1986).

La eficacia en la detección de metástasis subclínicas usando AcMs está aún en investigación. En un caso publicado (Donoso et al., 1985) empleando el anticuerpo monoclonal Mab8-1H fue demostrada la presencia de células de melanoma en la biopsia hepática. Debido al pequeño número de células que son dispersadas en las metástasis hematágenas de tumores sólidos como el melanoma uveal, la detección de células tumorales en sangre es difícil y necesitan ser desarrolladas técnicas más sensibles y específicas.

La tecnología del *DNA recombinante* ofrece un eficaz instrumento en la demostración de células tumorales metastásicas. La detección de material genético como DNA o RNA de células tumorales en sangre circulante tiene ventajas significativas sobre los métodos inmunológicos tradicionales: elevada especificidad conferida por las secuencias genéticas, elevada sensibilidad debido a los mecanismos de amplificación inherentes al DNA y procedimientos de laboratorio bien estandarizados y simples de realizar. Las técnicas de detección molecular requieren 2 pasos: primero es necesario identificar la secuencia genética de un antígeno que sea expresado específicamente en tumores y no esté presente normalmente en sangre

periférica; en segundo lugar es necesario idear una técnica sensible y específica para detectar el gen o producto genético en el suero.

Han sido estudiados dos posibles genes que codificarían antígenos específicos de melanoma uveal:

1) El primero es un antígeno asociado al melanoma uveal que es reconocido por el Ac monoclonal Mab8-1H (Donoso et al., 1985). El Mab8-1H se ha visto capaz de unirse a los AAMs retenidos en el 37% de secciones tisulares fijadas en formaldehído e incluidas en parafina (Donoso et al., 1985; Folberg et al., 1985). En un estudio, Mab8-1H se unió a más del 90% de los melanomas uveales analizados indicando la alta prevalencia de este AAM en los tumores (Donoso et al., 1985; Folberg et al., 1985). Para caracterizar la estructura molecular de este gen, Wang et al.(1992) clonaron y secuenciaron este AAM uveal. El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen AAM reveló que da lugar a una proteína transmembrana, compuesta por 238 aminoácidos y un peso molecular de unos 25 kD. El análisis de la secuencia de aminoácidos indicó que la proteína tenía 4 posibles dominios transmembrana. El gen AAM pertenece a una nueva familia proteica cuyos miembros comparten una remarcable homología secuencial sugiriendo un gen ancestral común. Todas las proteínas codificadas por estos genes han sido implicadas en la regulación del crecimiento. Los autores analizaron la expresión genética de este AAM ocular usando “southern y northern blots”. Parece existir una expresión incrementada de este gen al determinar (mediante “northern blot”) los niveles elevados de RNAm en tejidos de melanoma uveal.

2) Otro gen candidato es el gen de la tirosinasa (Smith et al., 1991), que es tejido-específico en los melanocitos. El enzima tirosinasa está implicado en la vía sintética de la melanina, convirtiendo la tirosina en dopa y dopaquinona. Ya que la melanina está presente sólo en melanocitos, la detección de transcripción de tirosinasa en sangre periférica indica la presencia de melanocitos circulantes. Éstos probablemente representan células de melanoma, ya que no se tiene conocimiento de la presencia de melanocitos normales en sangre periférica.

Diversos abordajes de biología molecular pueden usarse para detectar el material genético de productos tumor-específicos. Si hay una amplificación o reorganización genética (ADN) puede emplearse el “southern blot”. La actividad transcripcional de un gen (es decir, mRNA) puede también medirse directamente con

el "northern blot". Ambos métodos son extremadamente específicos debido a la exclusiva secuencia de nucleótidos de la sonda de DNA empleada para visualizar los fragmentos concretos de DNA o mRNA. Sin embargo, los métodos pueden no ser suficientemente sensibles para detectar pequeñas cantidades de DNA o mRNA presentes en el torrente sanguíneo.

Usando transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Smith et al.(1991) detectaron células de melanoma maligno circulantes en pacientes con melanoma cutáneo metastásico. El mRNA de sangre periférica fue extraído y convertido en cDNA por la transcriptasa inversa. El cDNA fue posteriormente amplificado usando la PCR y sondas DNA específicas para el gen de la tirosinasa. Cebadores específicos ("primer" o fragmento de DNA u oligonucleótido monocatenario) fueron empleados para realizar una segunda reacción de amplificación e incrementar el rendimiento de la reacción. Debido a la elevada eficiencia inherente a la amplificación con PCR ha podido detectarse el mRNA equivalente a dos células tumorales por milímetro de sangre. Fueron examinadas muestras de sangre de 7 pacientes con melanoma maligno de las que cuatro dieron resultados positivos, así como 8 muestras de control de las que todas resultaron negativas (Smith et al., 1991).

Actualmente, en algunos laboratorios (Wang et al., 1993) se están investigando las técnicas anteriores para detectar metástasis subclínicas de melanoma uveal. Para demostrar la viabilidad de la técnica, Wang et al. (1993) extrajeron el mRNA total de células de melanoma en cultivo y usando transcriptasa inversa obtuvieron el cDNA de la tirosinasa. Fueron realizadas varias PCRs empleando cebadores de DNA tirosinasa-específicos para examinar la cantidad presente de cDNA de tirosinasa. En la electroforesis en gel de agarosa fue demostrada la presencia del cDNA de la tirosinasa tras la amplificación con PCR. En este laboratorio están actualmente en curso estudios adicionales de la técnica y su aplicación al diagnóstico clínico de micrometástasis de melanoma uveal.

Como conclusiones y respecto a perspectivas futuras podemos subrayar que:

1) El uso de técnicas de biología molecular, como la PCR, puede mejorar significativamente nuestra capacidad para detectar metástasis subclínicas en pacientes con melanoma uveal.

2) Aunque parece probable que la presencia de células de melanoma en el torrente sanguíneo incremente la probabilidad de metástasis, son necesarios estudios más definitivos para determinar la relación entre la presencia de células tumorales circulantes y la evolución del paciente.

3) Hasta que tales estudios estén completos, el manejo clínico del melanoma uveal primario y sus metástasis continuará siendo controvertido. Los clínicos deben considerar cada situación clínica individualmente y seleccionar el plan de tratamiento más eficaz para cada paciente.

Modalidades terapéuticas

1) Factores que condicionan la elección terapéutica

Diversos factores deben ser tenidos en cuenta al recomendar el manejo terapéutico de un paciente concreto con un melanoma uveal posterior, como: tamaño, localización, patrón de crecimiento y signos de actividad del tumor, estado visual del ojo afecto y del contralateral, así como la edad y estado general del paciente.

Uno de los factores más importantes a la hora de decidir el tipo de tratamiento es el *tamaño del tumor*. Los melanomas de coroides y cuerpo ciliar han sido categorizados arbitrariamente por su tamaño de maneras diferentes. Aunque una categorización basada en el volumen del tumor es lógicamente apropiada, actualmente no hay ningún método simple y fiable para valorar el volumen tumoral. La práctica común de multiplicar máximo diámetro basal, mínimo diámetro basal y grosor, da lugar sólo a una valoración grosera del volumen real. La categorización por tamaños más frecuentemente empleada por los clínicos está en función del máximo diámetro basal y de la altura, elevación o grosor. En la práctica clínica, la base del tumor puede ser estimada en diámetros de disco óptico (DD) (1 DD = 1.5 mm). La elevación media

puede ser estimada en dioptrías (3 dioptrías = 1 mm). Para proporcionar medidas más exactas deben ser empleadas otras técnicas como la ultrasonografía.

De este modo, todas las lesiones de tamaño inferior a 5 mm de diámetro y 2 mm de elevación se consideran nevus. Un melanoma de tamaño pequeño es aquel que presenta un diámetro mayor comprendido entre 7-10 mm y un grosor entre 2-3 mm. Un melanoma de tamaño medio es el que tiene un diámetro mayor entre 10-15 mm y una elevación comprendida entre 3-5 mm. Un melanoma de tamaño grande es aquel cuyo diámetro mayor es superior a 15 mm y/o la altura es mayor de 5 mm. Los melanomas muy grandes son los que superan los 10 mm de elevación o altura (Capeans, 1993; Shieds et al., 1991).

Aunque desde el punto de vista oftalmológico se usa tanto el diámetro como el grosor del tumor para determinar el tamaño, la mayoría de los patólogos aplican una caracterización más simple basada sólo en la mayor dimensión del tumor. Los melanomas malignos uveales son divididos en tres grupos: pequeño, si el diámetro mayor es de 10 mm o menos; mediano, si es de 11-15 mm; y grande, si el diámetro mayor mide más de 15 mm.

La mayoría de los autores consideran que los melanomas “pequeños” (entre 2 y 3 mm de grosor y menos de 10 mm de diámetro) pueden ser manejados mediante observación periódica hasta que el crecimiento esté documentado. Sin embargo, está justificado emplear tratamiento activo (radioterapia local o termoterapia transpupilar) en pequeños melanomas si muestran signos de actividad en la visita inicial (Shields et al., 2002). El manejo de los melanomas de tamaño “medio” (entre 3 y 5 mm de altura y/o entre 10-15 mm de diámetro) puede incluir observación periódica, radioterapia, termoterapia transpupilar, resección local o enucleación, dependiendo de otros factores ya explicados. Los melanomas “grandes” (entre 5 y 10 mm de grosor y/o más de 15 mm de diámetro) son manejados generalmente con radioterapia, resección local o enucleación, también dependiendo de diversos factores. Los melanomas “muy grandes” (mayores de 10 mm en grosor) son generalmente tratados mediante enucleación, porque los métodos conservadores de terapia resultan finalmente en un considerable deterioro visual en la mayoría de los casos y el paciente no debería estar

sometido al seguimiento estrecho, por la morbilidad ocular asociada que acompaña frecuentemente al tratamiento conservador .

2) Selección del tratamiento

Hasta que los controvertidos aspectos del tratamiento del melanoma de úvea posterior estén resueltos, el manejo ideal de un paciente concreto seguirá siendo desconocido (Fine, 1987). El método de tratamiento debería ser cuidadosamente seleccionado para conseguir controlar el tumor y mantener la visión cuando esto pueda lograrse sin poner en peligro el estado sistémico del paciente.

El paciente debe ser informado de que, de acuerdo a los conocimientos actuales, radioterapia y enucleación conllevan una tasa de mortalidad semejante. Debe ser avisado del pronóstico visual tras los métodos de tratamiento y debe programar los exámenes de seguimiento oculares y sistémicos. La decisión definitiva respecto al tratamiento debe ser tomada por el paciente y el oftalmólogo una vez que todos los factores hayan sido considerados (Shields y Shields, 1993).

Las opciones actuales de tratamiento en melanomas de tamaño “mediano” y “grande” son:

a) Estándar:

1) *Observación* cuidadosa y frecuente; es una opción para pacientes con tumores “pequeños”, en los que el diagnóstico es incierto o el crecimiento del tumor no ha sido documentado. También es prudente en los pacientes asintomáticos con lesiones estables, en los ancianos, en los gravemente enfermos, y quizás en los pacientes con un tumor en crecimiento en su único ojo útil (Augsburger, 1993; Gass, 1980; Mims y Shields, 1978).

2) Irradiación:

- Local, con placas de cobalto-60, yodo-125 (irradiación gamma), o 106-Rutenio (irradiación beta) (Lommatzsc, 1986; Packer et al., 1992; Shields et al., 1993).

- Externa, con haz de protones (equipo especializado en el Massachusetts General Hospital, Boston-MA-) (Gragoudas et al., 1987; Gragoudas, 1994; Seddon et al., 1985; Seddon et al., 1990); Iones de helio (equipo especializado en Laboratorios

Lawrence Berkley, San Francisco-CA-) (Char et al., 1990; Char et al., 1993; Char, 1994; Linstadt et al., 1990).

3) *Enucleación* (Mieler, 1994; Shields y Shields, 1992).

4) *Enucleación con irradiación preoperatorio*, con haz externo (PERT) (Augsburger, 1987; Char y Philips, 1985).

b) *Bajo evaluación clínica:*

El manejo de melanomas coroideos “medianos” y “grandes” es controvertido. Algunos investigadores creen que la supervivencia tras la terapia con radiación es probablemente comparable a la supervivencia tras la enucleación; sin embargo, hay prominentes oftalmólogos que discrepan (Augsburger et al, 1990; Gragoudas et al., 1988; Mieler, 1994; Seddon et al., 1985). El COMS es un ensayo clínico multicéntrico (42 centros clínicos de EE.UU), “randomizado”, controlado, que compara la supervivencia de los pacientes con melanomas coroideos de “mediano” y “gran tamaño” con una de las dos estrategias de manejo (Straatsma et al., 1988). Tales ensayos clínicos de tratamiento están ahora justificados porque la tasa de error diagnóstico de melanomas de coroides ha ido descendiendo a menos del 0.5%; en la primera publicación del estudio 5 de más de 1000 casos fueron erróneamente diagnosticados.

El pronóstico para cualquier paciente con melanoma intraocular recidivante es malo, independiente del tipo celular o estadio. La cuestión y selección de tratamiento adicional depende de muchos factores, incluyendo la extensión de la lesión, tratamiento previo y localización de la recidiva, edad y salud del paciente, así como las consideraciones individuales del mismo. Los ensayos clínicos son apropiados y deberían ser considerados siempre que sea posible.

2. Modalidades terapéuticas

a) *Observación periódica.* El manejo de pequeños melanomas sospechosos generalmente implica un periodo de observación de posibles signos de crecimiento de la lesión u otros cambios. Actualmente no existe evidencia de que la observación de pequeños tumores coroideos incremente la mortalidad relacionada con el tumor; sin embargo, no ha sido establecido si los pacientes cuyos tumores se les permite crecer antes de ser tratados son situados con más riesgo de metástasis. Un ensayo clínico

“randomizado” que pudiese determinar de forma concluyente la conveniencia de la observación probablemente no es posible (Augsburger, 1993). Los estudios pronósticos han mostrado que muchas pequeñas lesiones tienden a permanecer inactivas y crecen lentamente con poco o ningún potencial metastásico (Gass, 1980). Además, algunas publicaciones sugieren que la enucleación podría facilitar las metástasis. El manejo apropiado de tales lesiones sigue siendo controvertido, pero el examen periódico sin intervención debe ser considerado antes de la intervención terapéutica cuando la lesión sea menor de 10 mm de diámetro y 2-3 mm de altura. Las pruebas más sensibles para documentar el crecimiento son la ultrasonografía y la fotografía, y deberían ser repetidas cada 6 meses o 1 año, o más frecuentemente si se sospecha crecimiento. La importancia del seguimiento y la comunicación de nuevos síntomas debería ser inculcada al paciente, porque a veces los tumores pueden mostrar un crecimiento bastante rápido.

El hallazgo clínico más importante que se correlaciona con el pronóstico tras el tratamiento es el tamaño del tumor (Gragoudas, 1994). El potencial maligno de grandes lesiones melanocíticas es suficientemente elevado como para justificar un tratamiento inmediato tras el diagnóstico. Por ello, la relación riesgo-beneficio no justifica la observación de melanomas “medianos” o “grandes”, excepto en las raras situaciones clínicas en las que el diagnóstico está en duda (Gragoudas, 1992).

La observación es una opción adecuada para pacientes en los que el diagnóstico es dudoso o el crecimiento del tumor no está documentado. La observación también es prudente en casos asintomáticos con lesiones estables, particularmente pacientes ancianos o severamente enfermos y en pacientes con crecimiento tumoral en su único ojo útil. No se han observado muertes por metástasis en pacientes con melanoma de coroides de medidas inferiores a 7x7x2 mm (Char, 1978). Para clarificar las opciones terapéuticas fue diseñado el COMS (Staatsma, 1988). Debido a que no hay acuerdo respecto al manejo de melanomas uveales “pequeños”, los investigadores del COMS seleccionarán un tratamiento, que es frecuentemente la observación, tras comentarlo con los pacientes. Para los pacientes con tumores “medianos” y “grandes” se han realizado ensayos clínicos prospectivos y “randomizados” que han sido publicados recientemente (Melia et al., 2001; Sieving, 2001; Jampol et al., 2002).

b) Fotocoagulación. La fotocoagulación con arco de xenon o láser de argon es un método de destrucción local de melanoma de coroides sin sacrificar el ojo afecto.

Es empleada mucho menos frecuentemente que hace 20 años; sin embargo, todavía es un método útil para pequeños melanomas de coroides seleccionados (p.e., no puede ser empleada en tumores del cuerpo ciliar). Debido a que requiere múltiples sesiones terapéuticas y que puede originar tracción vitreorretiniana, la radioterapia se ha hecho más popular en los últimos años.

En el momento actual, la fotocoagulación tiene unas aplicaciones muy limitadas. Está indicada en pequeños melanomas con evidencia de crecimiento o signos de actividad; sin embargo, los tumores pequeños son seguidos sin ninguna intervención en la mayoría de los centros debido a su curso aparentemente benigno. También se emplea en melanomas de mediano tamaño seleccionados y como tratamiento suplementario para un tumor residual o recidivante, tras otras modalidades terapéuticas como radioterapia o resección local (Shields, 1994). Gragoudas et al. (1992) emplean esta técnica sólo para recidivas marginales observadas tras irradiación con protones, ya que éstas generalmente representan extensiones planas del tumor que pueden ser fácilmente fotocoaguladas.

La técnica consiste en intensas y repetidas aplicaciones de fotocoagulación alrededor del tumor, para disminuir su aporte sanguíneo y directamente sobre el tumor, para destruir sus células. Suele requerir entre 4 y 10 sesiones terapéuticas para alcanzar el resultado adecuado: una cicatriz deprimida, compuesta por una fina capa de tejido fibrogial sobre la esclera desnuda (Shields, 1994).

La tasa de fallos tras fotocoagulación es elevada y recidivas tumorales han sido observadas muchos años después de la fotocoagulación. Ya que los efectos térmicos pueden no extenderse más allá de las capas superficiales del tumor, es difícil determinar si el melanoma ha sido destruido y siempre hay riesgo de extensión extraescleral. La presencia de decoloración amarillenta sobre el tumor tratado es frecuentemente confundida con esclera desnuda, pero puede representar realmente una cicatriz fibrótica. En tales casos, las células malignas pueden continuar creciendo bajo la superficie de la lesión (Gragoudas, 1992; Shields, 1994). El tratamiento mediante fotocoagulación es frecuentemente más efectivo si el tumor tiene menos de 3 mm de grosor, medido por ultrasonografía (Shields, 1994).

Por último, la *terapia fotodinámica* (que implica la inyección de colorantes fotosensibilizantes seguida de irradiación láser en el pico de absorción del colorante usado) es una nueva y prometedora modalidad (Panagopoulos et al., 1989). Los ensayos iniciales con colorante derivado de la hematoporfirina y fotocoagulación con láser no se han mostrado efectivos en la destrucción de melanomas uveales (Schmidt-Erfurth et al., 2002).

c) Radioterapia. La radioterapia es el método de tratamiento conservador más ampliamente usado para los melanomas de úvea posterior y, a pesar de la relativa radiorresistencia de estas lesiones, su efectividad en destruir melanomas ha sido bien documentada.

Existen dos principales técnicas radioterapéuticas para los melanomas uveales:

a) *Braquiterapia* o placas radioactivas suturadas a la esclera sobre el área del tumor (Lommatzsch, 1986; Packer et al., 1992; Shields et al., 1993): diversas placas oftálmicas pueden ser efectivas en el tratamiento de melanomas de “mediano” tamaño: cobalto⁶⁰, rutenio¹⁰⁶, iridio¹⁹² e iodo¹²⁵ (Gragoudas, 1992).

Stallard (1961) fue el primero que popularizó el empleo de placas de *cobalto⁶⁰* / Co⁶⁰ en el tratamiento de melanomas de coroides. Los resultados iniciales fueron muy prometedores, pero una gran morbilidad ocular y, especialmente, una vasculopatía por radiación visualmente destructiva se desarrolló entre 2 y 3 años tras la irradiación (Guyer et al., 1992). Aunque recientemente han sido publicados mejores resultados con el uso de placas de cobalto, debido a la relativamente alta incidencia de complicaciones con esta terapia han sido utilizados otros isótopos que irradian al melanoma uveal más selectivamente.

Un aplicador de radiación beta empleando *rutenio¹⁰⁶* / Ru¹⁰⁶ ha sido ampliamente usado en Europa (Lommatzsch, 1986). Con este aplicador se podía lograr una significativa preservación de estructuras normales y una reducida exposición radioactiva de los técnicos. Sin embargo, debido a que la penetración de la irradiación es limitada con esta placa es recomendada generalmente para tumores de menos de 15 mm de diámetro basal y 5 mm de altura.

El *iodo¹²⁵* (I¹²⁵), emisor de radiación gamma, puede ser protegido de forma efectiva y se ha hecho una popular placa radioactiva para el tratamiento de los

melanomas de úvea en los EE.UU (Packer et al., 1992). Tiene mayor penetración que las placas de Ru¹⁰⁶ y pueden ser tratados tumores de hasta 8 mm de elevación. Debido a su relativamente corta vida media, las placas de I¹²⁵ son más costosas que las de Co⁶⁰ y su dosimetría más complicada. Su protección efectiva puede reducir el daño a las estructuras normales, pero, por el limitado campo de irradiación, el riesgo de recidivas locales es mayor que con aplicadores de Co⁶⁰.

Las indicaciones relativas para el uso de diferentes placas radioterapéuticas son inciertas, pero la elección del isótopo depende en parte de la elevación del tumor tratado. Ru¹⁰⁶ e I¹²⁵ son probablemente mejores para tumores mínimamente elevados, I¹²⁵ para tumores medianos y Co⁶⁰ para melanomas muy elevados. En tumores “grandes” se ha visto una mejor agudeza visual y una menor incidencia de glaucomas secundarios con resección transescleral del tumor con I¹²⁵ (Bechrakis et al., 2002; Shields et al 2002). Radioterapeutas oncológicos determinan, mediante un programa informático, la duración de la placa requerida para administrar unos 40.000 cGy en la base y 8.000 cGy en el ápex del tumor (Shields et al., 1993).

b) Teleterapia, o irradiación mediante un haz externo usando partículas cargadas como protones acelerados (Gragoudas et al., 1987; Gragoudas et al., 1988; Seddon et al., 1990) o iones de helio (Char et al., 1990): desde 1946 en que se sugirió que la irradiación con protones acelerados sería un tratamiento factible para tumores dentro del cuerpo humano, diversos haces de partículas cargadas han sido investigados clínicamente y miles de pacientes tratados hasta la fecha. La terapia con partículas cargadas es empleada en melanomas de coroides en ciertos centros, ya que este tratamiento requiere equipamiento especial, y los resultados han sido alentadores (Gragoudas et al., 1991; Gragoudas, 1992; Seddon et al., 1990).

Las ventajas de la irradiación con partículas cargadas se basan en las características físicas de los protones e iones de helio, que hacen posible una distribución de dosis extremadamente localizada. Estas partículas cargadas con alta energía tienen una mínima dispersión y un rango bien definido en tejidos, que es delimitado y dependiente de la energía; éstas pueden ser alineadas o colimadas en finos haces y liberar la máxima densidad de ionización cuando se detienen, resultando en una dosis máxima llamada “pico braga/bragg peca” (Albino, 1995) al final del recorrido del haz. La dosis uniforme de radiación administrada a la totalidad del tumor y la brusca reducción de la dosis fuera del área tratada incrementa la proporción de

tumores que pueden ser así manejados (con respecto al tamaño y localización de la lesión) y mejora la relación control local versus complicaciones. Tumores más grandes pueden ser tratados, porque el volumen global irradiado es reducido y de este modo la tolerancia del ojo a la irradiación es incrementada. Ojos con tumores próximos a estructuras críticas, como la mácula y nervio óptico, pueden ser irradiados y, aún así, mantener potencial visual, ya que la dosis es bruscamente reducida fuera del objetivo a tratar.

Desde que la irradiación con partículas cargadas fue introducida por primera vez en el Harvard Cyclotron (Boston), por Gragoudas, más de 4000 pacientes han sido tratados con este método en todo el mundo. Actualmente se emplean partículas cargadas en algunos centros de EE.UU. y Europa que poseen equipos especializados, tales como: Massachusetts General Hospital (Gragoudas et al., 1991; Gragoudas, 1992; Seddon et al., 1985; Seddon et al., 1990), Boston-MA y Lawrence Berkeley Laboratories (Char, 1989; Char et al., 1990; Char et al., 1993), San Francisco-CA, etc. La experiencia de Gragoudas indica que tumores muy grandes pueden ser tratados con esta modalidad y que el ojo puede tolerar irradiación hasta el 30% de su volumen con las dosis empleadas en este momento; en la actualidad, cada paciente recibe una dosis total de 70 “cobalt Gy equivalent” (CGE), una radiación total de 6000 cGy administradas en cinco sesiones durante 7-10 días.

Los pacientes con melanoma uveal con mayor riesgo de pérdida visual tras radioterapia con partículas cargadas son aquellos con tumores más elevados, particularmente más de 8 mm, y aquellos con tumores situados a menos de 3 mm del nervio óptico o de la fovea. La irradiación con haz de protones generalmente resulta en maculopatía por radiación, pero la visión ambulatoria es preservada en la mayoría de los pacientes. Las tasas acumulativas de pérdida visual entre sujetos con tumores a menos de 3 mm del disco o la fovea son 33% y 47%, a 1 y 2 años tras el tratamiento, comparados con 17 y 28% respectivamente, para sujetos con tumores localizados más lejos de ambas estructuras. A pesar de la desfavorable localización de los tumores cercanos al disco o la fovea, el 53% de pacientes con una AV pre-tratamiento de 20/200 o mejor retienen su nivel de visión 2 años tras la terapia.

La probabilidad de retener el globo ocular tras la irradiación con protones acelerados es del 90 y 95%, 2 y 5 años post-irradiación, respectivamente. El 3% de los ojos son enucleados durante el primer año postratamiento y la tasa anual decae a 1% en el cuarto año. La complicación más probable que resulta en enucleación es el

glaucoma neovascular. La recidiva local del tumor tras irradiación con partículas cargadas es observada en aproximadamente el 3% de los ojos tratados. La probabilidad de desarrollar metástasis tras la irradiación con partículas cargadas es de, aproximadamente, el 20% (Gragoudas et al., 1988). El hígado es inicialmente afectado en más del 90% de los pacientes con metástasis. Los factores pronósticos para el desarrollo de metástasis son comparables a aquellos encontrados para pacientes tratados por enucleación y el peor pronóstico está asociado con el mayor diámetro tumoral, afectación del cuerpo ciliar, edad avanzada y extensión extraescleral.

Los resultados de la radioterapia son alentadores (Li et al., 2003). Recientes avances en las técnicas de irradiación han hecho posible salvar el ojo en pacientes con melanomas considerados de “medianos” a “grandes” en tamaño (Gragoudas et al., 2002). Evaluaciones a medio plazo muestran similares tasas de supervivencia a la enucleación (Augsburger et al., 1990; Manschot y van Strik, 1987; Shields et al., 1993).

La mayoría de los tumores presentan regresión después de los primeros 6 meses post-irradiación, siendo el rango habitual entre 1 y 24 meses. Hay una importante tendencia de los tumores más elevados a mostrar, proporcionalmente, mayor disminución en la altura; la completa desaparición del tumor, con formación de una cicatriz plana, se observa en un pequeño número de ojos tratados. Sin embargo, una continua regresión ha sido advertida en la mayoría de los tumores años tras la irradiación (Gragoudas, 1992).

De forma general, la reducción del tumor tras la irradiación es lenta y los mecanismos de regresión tumoral son bastante complejos y muy probablemente implican múltiples factores. Aunque la regresión tumoral es principalmente debida a destrucción (muerte directa) de las células tumorales por la irradiación, el efecto de la radioterapia en los vasos tumorales puede también jugar un papel en la regresión del melanoma uveal. Estudios tras el empleo de haz de protones sugieren que la irradiación causa una destrucción tisular relativamente rápida, quizás mediada por un mecanismo inmune (Chiquet et al., 2000) y una lesión del ADN cromosómico, con una subsecuente pérdida de capacidad de proliferación del tejido tumoral (Royds et al., 1992). Aunque la afectación del ADN es un resultado inmediato de la irradiación que convierte al tumor en estéril al completar el tratamiento, este daño se hace letal sólo cuando la célula entra en mitosis. La regresión tardía vista en algunos de estos tumores irradiados y la presencia de figuras de división celular en secciones histológicas de

ojos enucleados tras la radioterapia son, probablemente, debidas a las prolongadas fases intermitóticas en las células del melanoma. Este punto de vista es apoyado por el hallazgo de mayores tasas de metástasis entre pacientes con tumores de rápida disminución, comparados con pacientes con tumores de lenta reducción, durante los primeros 2 años tras la irradiación. Una interpretación de este hallazgo es que la radiosensibilidad de un tumor es directamente proporcional a su potencial maligno. La única prueba de viabilidad celular post-irradiación es la recidiva local del tumor tratado. La ausencia de regresión post-irradiación no es una indicación de tumor viable (Gragoudas, 1992). Por ello, a menos que un tumor demuestre un crecimiento definido tras la terapia, el seguimiento sin intervención es el abordaje más prudente.

Las principales complicaciones de la irradiación intraocular son: retinopatía por radiación, neuritis óptica por radiación, rubeosis de iris y glaucoma neovascular, hemorragia vítrea, catarata post-irradiación, oclusión puntal con epífora, queratoconjuntivitis seca, uveítis anterior, necrosis escleral y diplopía persistente.

Todos los autores no están de acuerdo respecto a la incidencia de complicaciones. Shields (1992; 1993) considera que las complicaciones son más frecuentes y severas en la radioterapia con partículas aceleradas o iones pesados. Sin embargo, Char et al. (1993), en un estudio prospectivo “randomizado” que comparaba tasas de complicaciones en melanomas de <15 mm diámetro y <10mm altura tratados con partículas cargadas o braquiterapia con I^{125} , encontraron de manera general con partículas cargadas una mejor tasa de control tumoral y más complicaciones en el segmento anterior, especialmente pérdida de pestañas, catarata y glaucoma neovascular. Esta última complicación fue la principal razón para enucleación en este grupo de tratamiento. Por el contrario, cuando se usaban placas radioactivas de I^{125} se producían más complicaciones en el segmento posterior y la incidencia de recidiva local era algo más alta (Char et al., 1993; Char, 1994). La mayoría de las enucleaciones tras la braquiterapia fueron ocasionadas por fallo en el control tumoral. Otros estudios a corto plazo muestran de forma global que el control local del tumor, la tasa de enucleación por complicaciones y la supervivencia son similares para los dos tipos de tratamiento.

d) Resección local. La resección local fue inicialmente empleada para melanomas de la úvea anterior. En los últimos 20 años, varios grupos de autores han empleado diversos métodos para eliminar quirúrgicamente tumores localizados más

posteriormente en la coroides (Foulds, 1990; Peyman et al., 1984; Shields et al., 1993; Shields, 1994). Algunos autores son bastante entusiastas sobre la eliminación de melanomas mediante técnicas de vitrectomía o resección "ab interno", aunque parece preferible eliminar el tumor intacto sin su disrupción con tales métodos (Mittica et al., 2003). Durante las pasadas dos décadas, la eliminación quirúrgica de melanomas coroideos posteriores ha sido realizada tanto como una resección de pared ocular de espesor total o como una coroidectomía, tras la disección de un tapete escleral sobre el área del tumor (Gragoudas, 1992). Actualmente, autores como Shields (1993) emplean una técnica de resección "ab externo" que denominan *esclerouvectomía lamelar parcial* (EULP). Aunque generalmente es posible eliminar melanomas de cuerpo ciliar y coroides satisfactoriamente mediante esta técnica, el procedimiento quirúrgico es laborioso, requiere técnicas e instrumentación especiales y debería ser realizado por cirujanos con experiencia (Shields et al., 1993).

Las indicaciones relativas para la resección local de un melanoma uveal posterior son:

- Un tumor de cuerpo ciliar o ciliocoroideo en crecimiento, que no se extienda más de 4 horas de reloj de la pars plicata.
- Un tumor coroideo en crecimiento que no sea mayor de 15 mm de diámetro y esté centrado cerca o anterior al ecuador, o que su margen posterior no esté a menos de 5 mm del disco óptico o de la fovea.

Debe ser resaltado que los melanomas que cumplen estos criterios pueden también ser manejados con radioterapia en la mayoría de los casos. La EULP es generalmente preferida cuando el melanoma está localizado más anteriormente, tiene una base menor y una altura mayor. La radioterapia es preferible cuando el melanoma está localizado más posteriormente, tiene una base más amplia y menor altura.

La técnica de resección "ab interno" descrita con detalle en la literatura no se discute aquí porque la mayoría de los autores consideran que la EULP es una alternativa preferible (Shields y Shields, 1992; Shields et al., 1993). La EULP está diseñada para extirpar el tumor uveal junto con la porción interna de la esclera, dejando intacta la esclera externa y la retina sensorial suprayacente. Tal como se indicó previamente, es especialmente aplicable para tumores de cuerpo ciliar y coroides periféricos. Básicamente consiste en crear un colgajo escleral sobre el tumor

y extraer éste con una fina capa de fibras esclerales adyacentes, intentando dejar retina y vítreo intactos (Shields et al., 1993; Shields, 1994).

Las primeras críticas de esta técnica incluyeron la posible diseminación de células tumorales en la órbita y en la circulación sistémica. Aunque no hay disponibles datos de seguimiento a largo plazo, los resultados actuales parecen comparables a la enucleación con respecto a las muertes por metástasis. Sin embargo, la dificultad de los procedimientos, sus limitadas aplicaciones, la incidencia bastante alta de complicaciones severas precoces (hemorragia vítrea o subretiniana, catarata, desprendimiento de retina) y las recidivas locales, impiden el empleo generalizado de estas técnicas quirúrgicas. En el momento actual, la radioterapia parece estar asociada a una menor morbilidad que la resección local y ha sido más ampliamente aceptada. Sin embargo, Shields et al. (1994) han manejado más de 250 casos con EULP y los resultados continúan mejorando.

e) Eucleación. El papel de la enucleación en el tratamiento de melanomas coroideos posteriores es controvertido, pero continua siendo la terapia estándar para la mayoría de los melanomas de coroides “grandes” y los que causan severo glaucoma o invaden el nervio óptico (Mieler, 1994). No existen datos para demostrar que este procedimiento radical prolongue la vida del paciente comparado con otras formas de terapia. Además, no hay datos publicados que muestren un efecto adverso en la supervivencia entre los pacientes tratados con irradiación (Gragoudas et al., 1987; Mieler, 1994). Entonces, ¿qué pacientes deben ser enucleados?: los pacientes con un melanoma coroideo que afecta más del 30% del volumen ocular, los melanomas con extensa neovascularización en un ojo doloroso y los tumores con gran extensión extraescleral son indicaciones bien aceptadas para la enucleación (Gragoudas, 1992; Mieler, 1994). No obstante, recientes publicaciones han mostrado que la enucleación podría no resultar en mejoría de la supervivencia y que podría realmente originar metástasis tumorales. Por ello, el resto de los pacientes deben ser informados acerca de lo que se conoce actualmente respecto a los resultados y potenciales complicaciones de las diversas formas de tratamiento. Aunque aún no estén disponibles los resultados de ensayos “randomizados” comparando enucleación y radioterapia, los datos actuales indican que la radioterapia no tiene efecto negativo sobre la supervivencia.

El papel de la manipulación quirúrgica durante la enucleación sigue siendo controvertido. Una técnica denominada "no-touch" fue propuesta y desarrollada para evitar o minimizar la diseminación de células tumorales durante la enucleación (Wilson y Fraunfelder, 1978), pero no ha sido ampliamente aceptada y fué abandonada por muchos clínicos, ya que nunca se ha probado que sea superior a un procedimiento de enucleación cuidadoso, realizado por un cirujano entrenado. Actualmente, autores como Shields et al.(1992) aconsejan una enucleación estándar con "mínima manipulación" en lugar de intentar congelar la base del tumor.

La irradiación externa preoperatoria (PERT) o postoperatoria es un abordaje prometedor que podría disminuir las posibilidades de precipitar metástasis. El valor de la irradiación preenucleación en el manejo de melanomas uveales es incierto. Si nos basamos en que células neoplásicas pueden diseminarse en el momento de la enucleación, entonces la irradiación previa sería el procedimiento que podría transformar estas células en no viables e incapaces de causar metástasis. Estudios preliminares muestran muy poca morbilidad con esta técnica, pero aún no ha sido demostrado el efecto beneficioso de la irradiación pre-enucleación (Char y Philips, 1985; Char, 1989). Está siendo valorada de manera prospectiva como parte del COMS para melanomas grandes (>10 mm de altura y/o >16 mm diámetro) que van a ser enucleados (Schachat, 1989).

f) Exenteración orbitaria. La extensión extraocular del melanoma generalmente confiere un mal pronóstico. Para pacientes con gran afectación tumoral de la órbita, el tratamiento requiere exenteración orbitaria, frecuentemente combinada con radioterapia pre- o postoperatoria. Sin embargo, no existe evidencia de que esta cirugía radical vaya a prolongar la vida. El papel de la exenteración en casos de extensión extraocular continua siendo controvertido. Algunos investigadores proponen la exenteración para todos los melanomas coroideos con extensión extraescleral, pero otros estudios no muestran ventaja de la exenteración con respecto a la supervivencia (Affeldt et al., 1980). Actualmente, la mayoría de pacientes con extensión extraocular localizada o encapsulada no son exenterados (Gragoudas, 1992; Shamma y Blodi, 1977; Shields y Shields, 1991).

g) Manejo de las metástasis sistémicas. Los resultados terapéuticos de las metástasis viscerales del melanoma uveal son malos y la tasa global de supervivencia en un año es aproximadamente 13% (Gragoudas et al., 1991). El tratamiento se limita a la radioterapia paliativa, ocasionalmente la resección local de un foco metastásico aislado, la quimioterapia sistémica y, quizás, la inmunoterapia, aunque ninguno ha mostrado claramente mejorar la supervivencia. Gragoudas et al. (1991), en las series de pacientes que desarrollaron metástasis, tras la irradiación con haz de protones, encontraron una supervivencia significativamente más larga en pacientes diagnosticados durante un examen de despistaje (“cribado” o “screening”), en pacientes más jóvenes y en aquellos que recibieron tratamiento para las metástasis: la supervivencia media fue 2 meses para los pacientes que no recibieron tratamiento, en comparación con los 5.2 meses para aquellos que recibieron tratamiento para las metástasis.

Nuevos abordajes como la quimio-embolización del hígado y el uso de interleuquina-2, en combinación con células “killer” activadas por linfoquinas de linfocitos infiltrantes del tumor han generado considerable interés, pero, hasta la fecha, las remisiones siguen siendo infrecuentes y la toxicidad es elevada (Gragoudas et al., 1991). Los más recientes avances proponen tratar a los pacientes con vacunas terapéuticas, que incrementen la inmunidad a antígenos asociados al melanoma. Estudios “randomizados” de las más prometedoras de éstas modalidades deben ser iniciados.

h) Otras opciones terapéuticas. La *diatermia* fue ocasionalmente usada en el pasado, pero este método adelgaza la esclera, creando una posible ruta de extensión extraescleral, por lo que ha sido abandonado en el tratamiento de estos tumores.

La *crioterapia*, aunque puede ser efectiva en el tratamiento de otros tumores intraoculares (retinoblastoma, hemangioma capilar de la retina), apenas ha sido empleada en los melanomas uveales y parece que actualmente no tiene ningún papel en su tratamiento.

La ya comentada *fotorradiación* se basa en la administración sistémica de un derivado de la hematorfirina, un compuesto fotosensibilizante que es retenido principalmente por las células malignas y la fotoactivación de la neoplasia, con luz roja (630 nm), para lograr una destrucción selectiva de las células cancerosas.

Los experimentos realizados empleando la *hipertermia* en el tratamiento del melanoma uveal parecen más alentadores. Una de las modalidades combina la acción de la hipertermia originada por microondas (con un aplicador oftálmico especial) y la radiación de placas de I^{125} . Los recientes resultados de series de pacientes tratados de este modo sugieren que la termoterapia coadyuvante permite reducir las dosis de la placa radiactiva. Se han visto buenos resultados en el control tumoral y escasas complicaciones con la asociación de termoterapia transpupilar y placas radiactivas (Shields et al., 2002). Aunque la incidencia de complicaciones es similar al uso exclusivo de radiación, las agudezas visuales de los ojos tratados con placas de *termorradioterapia* resultaron ser superiores (Finger, 1997). La otra modalidad es la *termoterapia transpupilar*, empleando como fuente de calor radiación infrarroja que actúa directamente sobre las células tumorales, con escasas complicaciones oculares (Journee de Korver y Keunen, 2002). Los melanomas intensamente pigmentados absorben mejor la radiación (Conolly et al., 2003), empleándose verde de indocianina en los tumores amelanóticos para incrementar la captación de calor (De Potter y Jamart., 2003). Parece un tratamiento efectivo para pequeños tumores posteriores. A pesar del satisfactorio control de la lesión (fue efectivo en el 94% de los casos, resultando en una cicatriz atrófica), se requiere un seguimiento superior a 15-20 años antes de disponer información definitiva respecto a resultados finales de AV, recurrencias locales y pronóstico sistémico (Shields et al., 1998).

i) Conclusiones. Un número de cuestiones permanece sin respuesta respecto a la terapia del melanoma uveal, pero la extensa investigación clínica de los últimos 20 años nos permite formular un razonable abordaje para tratar estos tumores:

-Tumores pequeños asintomáticos, de menos de 10 mm de diámetro y 2-3 mm de altura, deben ser observados hasta que el crecimiento esté documentado. Hay acuerdo en que la observación hasta documentar crecimiento supone poco riesgo.

-Tumores pequeños que crecen durante el periodo de observación, tumores de mediano tamaño (entre 10 y 15 mm de diámetro y/o 3-5 mm de elevación) y la mayoría de los tumores grandes (>15-20 mm de diámetro y/o >5-10 mm de altura) deberían ser tratados de forma conservadora. La terapia de melanomas de mediano tamaño sigue siendo la más controvertida. Los melanomas intraoculares grandes generalmente requieren irradiación o enucleación.

-La radioterapia es el método conservador más ampliamente aceptado y la irradiación con partículas cargadas se asocia probablemente a menos morbilidad que las placas radioterapéuticas, especialmente para tumores grandes y tumores cercanos a la mácula y el nervio óptico.

-La enucleación debería ser realizada en ojos que no puedan ser salvados con métodos conservadores. Esto se debe a que los datos actuales indican que la aparición de enfermedad metastásica tras la irradiación no es mayor que la observada con enucleación usando controles no-randomizados.

-La quimioterapia no presenta buenos resultados en el tratamiento de los melanomas uveales (Cree, 2000)

Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS)

Debido a que el mejor tratamiento para pacientes con melanomas coroideos “medianos” y “grandes” no es conocido, un ensayo clínico patrocinado por el National Eye Institute, el “Collaborative Ocular Melanoma Study” (COMS) está en marcha (Schachat, 1989). El COMS es un ensayo clínico multicéntrico y prospectivo; los investigadores esperan que se pueda lograr una cualificada atención del paciente.

El propósito del estudio es evaluar las intervenciones empleadas para tratar pacientes con melanoma coroideo. Se han realizado dos ensayos clínicos como sub-estudios separados. Los pacientes con tumores de “mediano” tamaño fueron “randomizados” a recibir tratamiento con placas radioactivas de Iodo¹²⁵ o enucleación. Los pacientes con tumores “grandes” fueron “randomizados” para recibir enucleación, con o sin radiación preoperatoria con haz externo. El primer paciente fue incluido en noviembre de 1986 y la recopilación para esta porción del ensayo fue completada en diciembre de 1998. Los primeros resultados del ensayo han sido anunciados, afirmando que los principales factores de riesgo de fracaso terapéutico eran un mayor grosor tumoral, cercana proximidad del borde posterior tumoral a la zona avascular foveal, formas exofíticas y tumores asociados a desprendimiento de retina (Melia et al., 2001). Asimismo, se ha confirmado la eficacia de la braquiterapia con I¹²⁵, que permite un control local del tumor y la conservación del globo ocular, no observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a la enucleación en cuanto a supervivencia de los pacientes (Jampol et al., 2002)

Además de los ensayos “randomizados”, está en curso un estudio piloto de tumores “pequeños”. Los pacientes incluidos en este sub-estudio son manejados según las preferencias del paciente y el clínico. El objetivo de este estudio es determinar el número de pacientes con tumores pequeños que se presentan en los centros clínicos del COMS y cómo están siendo manejados esos pacientes. Se espera identificar métodos de manejo que sean candidatos para su evaluación en un ensayo clínico controlado y randomizado.

4. PATOBIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO NEOPLÁSICO

4.1. Aspectos generales

Fisiopatología de la proliferación celular

En condiciones normales, las características de un tejido adulto se mantienen constantes, gracias a una rutina invariable de división de la célula madre, diferenciación y muerte celular. Esto permite el mantenimiento de una masa y configuración tisular constante. El estado de equilibrio de un tejido normal, resulta de complejas interrelaciones entre:

- Señales extracelulares (factores de crecimiento), la unión de estos a sus receptores específicos en la membrana celular.
- Activación transitoria y limitada del receptor del factor de crecimiento, el cual, activa, a su vez, varias proteínas traductoras de la señal, situadas en la cara interna de la membrana citoplasmática.
- Transmisión, a través del citoplasma celular, de la señal transducida hasta que llega al núcleo, vía un segundo mensajero.
- Inducción y activación de factores nucleares reguladores que inician la transcripción del ADN.
- Entrada y progresión de la célula en el ciclo celular que termina con la división de la célula en dos células hijas.

El árbitro final de la interpretación y respuesta a estas señales, es la información contenida en el ADN nuclear, concretamente en los genes que podemos clasificar atendiendo a su función en:

Proto-oncogenes/oncogenes: son genes que dan lugar a las proteínas componentes del ciclo de división celular que favorecen el funcionamiento del ciclo y por lo tanto, la proliferación y multiplicación celular. Cuando los proto-oncogenes, sufren una mutación dan lugar a los oncogenes (genes que causan el cáncer), son las formas

activadas de los proto-oncogenes. Las mutaciones se producen por: a) cambios en la estructura del proto-oncogen, transformándose en oncogén, que traduciría una proteína anormal (oncoproteína) con una función anormal y b) cambios en la regulación de la expresión del proto-oncogén, ocasionando un aumento o producción inadecuada de una proteína promotora del crecimiento estructuralmente normal. Los alelos mutantes de los protooncogenes son considerados dominantes, pues transforman las células a pesar de la presencia de un homólogo normal.

Genes supresores: son los que originan proteínas que tienden a mantener bloqueado (frenado), el ciclo celular. Para que produzcan transformación celular tienen que estar dañados los dos alelos del gen, por lo que son referidos como oncogenes recesivos.

Genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis. Son dominantes como los proto-oncogenes, por lo que pueden comportarse como genes supresores de tumores. La velocidad de crecimiento de una célula en cada momento, es el resultado de la acción simultánea de los productos de estos tres tipos de genes.

Genes reparadores del ADN: la misión de estos genes es reparar los errores que se producen en la incorporación de nucleótidos durante el proceso de replicación normal del ADN, así como reparar las alteraciones (mutaciones) inducidas en la molécula de ADN por las radiaciones y agentes químicos.

El análisis del proceso de la proliferación celular, mecanismos moleculares y genéticos, en condiciones normales, nos permitirá comprender las alteraciones que contribuyen a la transformación neoplásica.

Factores promotores e inhibidores del crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas, codificadas por proto-oncogenes, presentes en el suero, y activas a bajas concentraciones. Se ha descrito un gran número de factores de crecimiento (Tabla 1), la mayoría activan la división celular, pero otros son factores inhibidores. Su misión es regular el crecimiento, la diferenciación, y la muerte celular; además de toda una serie de respuestas celulares como: movilidad, adhesividad, transferencia del impulso nervioso etc., es decir, están implicados en la

regulación de numerosos sistemas del organismo y son multifuncionales. Ejercen su acción, mediante la unión reversible y de alta afinidad, a moléculas específicas denominadas receptores que se encuentran en la membrana plasmática celular. Los factores de crecimiento ejercen su función, en relación con la célula sobre la que actúan, de manera endocrina, paracrina, autocrina, intracrina y yuxtacrina. Las células necesitan la presencia de los factores de crecimiento, estos las empujan a seguir el ciclo celular, en concreto, a pasar de la fase G1 a la S, sobrepasando el punto de restricción R. En ausencia de factores de crecimiento las células entran en fase de reposo celular.

Los factores inhibidores del crecimiento celular, son menos conocidos que los factores estimulantes. Entre ellos destaca el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), que tiene una función estimulante para unas células (células mesenquimáticas), e inhibidor para otras (células epiteliales, linfoides y endoteliales). Además tiene otras funciones como inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y tener capacidad de atraer células (quimiotaxis).

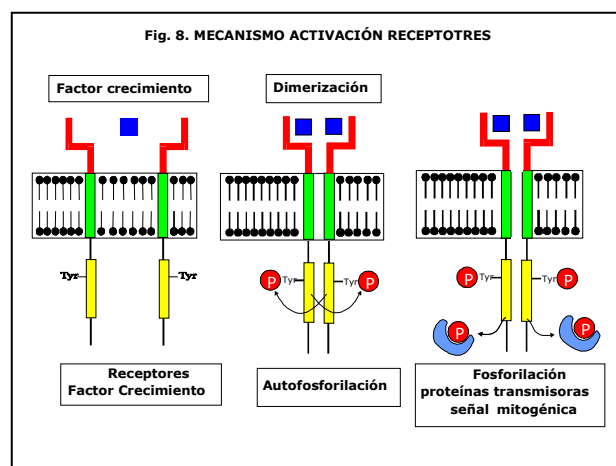
Sin embargo, la célula tumoral puede escapar en ocasiones a estos factores inhibidores por distintos mecanismos como: dejar de producir TGF, dejar de responder al no expresar sus receptores, y tiene una incapacidad para activar formas latentes inactivas del TGF β presentes en el entorno celular. Hoy se piensa que el fenómeno de cambio de sensibilidad al TGF β , se produce como resultado de las alteraciones celulares subyacentes a la transformación cancerosa.

Tabla 1 . Factores de crecimiento y proto-oncogenes que los codifican	
Familia del <i>Factor de crecimiento epidérmico</i> Proto-oncogenes reguladores: ▪ oncogén c-erb B-2/NEU	<ul style="list-style-type: none"> • EGF: Factor de crecimiento epidérmico • TGFα: Factor transformante α • Anfirregulina • Factor de crecimiento unido a heparina
Familia del factor de crecimiento fibroblástico Proto-oncogenes reguladores: ▪ FGF-3 o int-2 ▪ FGF-4 o hst ▪ FGF-5	<ul style="list-style-type: none"> • FGF-1/FGFa: factor ácido • FGF-2/FGFb: factor básico • FGF-3.-4.-5.-6 • FGF-7/kFGF Factor de crecimiento de los queratinocitos • FGF-8/AIGF FC inducido por andrógenos • FGF-9/GAF.FC activador glía
Familia del factor de crecimiento transformante (<i>TGF</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β_1-Factor de crecimiento transformante β_1 • TGF-β_2 Factor de crecimiento transformante β_2 • MIS- Sustancia Mulleriana inhibidora
Familia del factor de crecimiento derivado de la insulina(<i>IGF</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I Factor de crecimiento de insulina (I) • IGF-II Factor de crecimiento de insulina (II) • Relaxin.
<i>Otros del factor de crecimiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de crecimiento nervioso-NGF • Factor de crecimiento derivado de plaquetasβ y α (oncogén c-sis) PDGF • Factor estimulante de colonias CSF • Factor de crecimiento endotelial vascular -VEGF (Factor angiogénico) • Factor de crecimiento derivado de plaquetas PD-ECGF • Herregulina o NDF(F.T. DE NEU)

Receptores de factores de crecimiento

Los receptores de los factores de crecimiento son las siguientes estructuras que nos encontramos en el camino de transmisión de la señal mitógena. Son proteínas situadas en la superficie celular, a las cuales se unen de forma específica los factores de crecimiento.

Estructuralmente, se trata de largas moléculas que atraviesan la membrana celular, con un dominio o región extracelular, responsable de la unión con un factor de crecimiento específico (su ligando), un dominio o región transmembrana hidrofóbico que



sirve de anclaje, conectado con un tercer dominio citoplásmico responsable de la actividad quinásica. Pueden estar formados por una o dos cadenas polipeptídicas, y en

su mayoría, los receptores, son enzimas con actividad tirosín-quinasa, que fosforilan tirosinas de otras proteínas y de su propia molécula.

La misión de los receptores es sensibilizar a la célula de la llegada de los factores de crecimiento, enviando una señal al interior celular. Tras la unión del factor específico; unión que depende de la concentración del factor en el medio extracelular y de su afinidad por el receptor, se ponen en marcha una serie de mecanismos como, la asociación de los receptores en la membrana celular formando dímeros, activación de su capacidad quinásica y por último se autofosforilan (o mejor dicho se transfosforilan). Así cada molécula de receptor introduce un grupo fosfato en residuos concretos de tirosina del dominio intracelular de la otra molécula del receptor a la que esta asociada. Esta autofosforilación activa los receptores, capacitándolos ahora para fosforilar otras proteínas celulares y transmitir así la información que inducirá el crecimiento celular (Fig.8). Además de receptores con actividad tirosín-quinasa, las células presentan otros tipos de receptores, aunque en menor número. Todos estos receptores están codificados por proto-oncogenes, que podemos clasificar según el tipo de receptor que codifican (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de receptores y proto-oncogenes que los codifican.	
RECEPTORES CELULARES	EJEMPLO DE LIGANDOS
R. con actividad tirosín-quinasa (C-cerbB2/neu)	FC: PDFG, EGF
R. sin actividad tirosín-quinasa	
<ul style="list-style-type: none"> • Con actividad serín/treonín-quinasa. • Asociados a tirosín-quinasas. • Con actividad fosfotirosín-fosfatasa. 	TGF- β Citoquinas (IFNs). Proteínas de matriz.

¿Cómo se altera la función normal de los receptores y se transforman en oncogénicos?

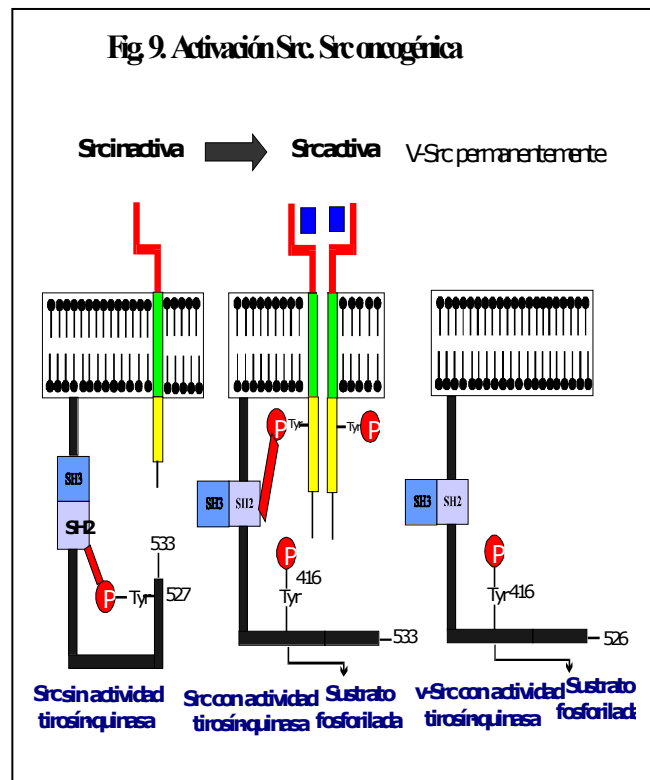
En la versión oncogénica de estos receptores se produce una dimerización persistente del receptor y su activación consiguiente sin necesidad de estar unido a su factor de crecimiento específico, por lo que el receptor manda señales mitógenas de forma continua hacia el interior del núcleo celular.

Las mutaciones más frecuentes que activan los receptores y los convierten en oncogénicos suelen ser la pérdida del dominio extracelular, pero también se han visto mutaciones puntuales en los dominios extracelulares y transmembrana, así como reordenamientos de genes y sobreexpresión de estos por amplificación.

Proteínas citoplasmáticas que transducen la señal mitogénica.

Una vez que los factores de crecimiento se han unido a sus receptores de membrana y se ha producido la activación de la actividad quinasa, el siguiente paso en la traducción de la señal mitogénica, es la unión de diversas proteínas citoplasmáticas a los residuos de tirosina que han sido fosforilados en el receptor.

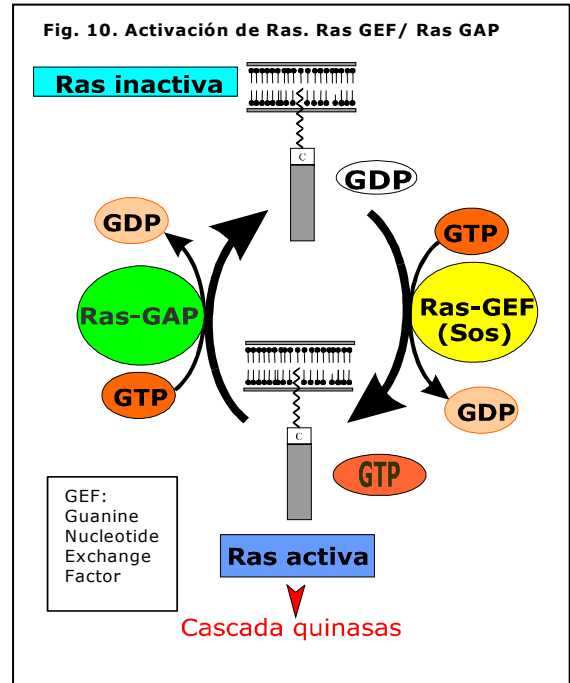
La mayoría de las proteínas citoplasmáticas están situadas en la cara interna de la membrana citoplásmica, donde reciben la señal desde el exterior de la célula; la activación de estas proteínas depende de su unión a la membrana. Bioquímicamente son heterogéneas, y funcionalmente tienen actividad tirosín-quinasa. La falta de regulación de su actividad causa la transformación oncogénica.



Entre las proteínas citoplasmáticas que transducen la señal mitogénica al núcleo destacamos la proteína Src (Fig.9) y las proteínas G (Fig.10).

Las proteínas G se caracterizan por su capacidad de unir GTP y GDP con alta afinidad y especificidad) (McCormick, 1995; Waldman et al.,1996)(fig.11). De ellas hay que destacar la familia de proteínas Ras con una misión universal ya que están implicadas en:

- Transducción de la señal proliferativa inducida por: factores de crecimiento, receptores de factores y hormonas que se encuentran asociados a proteínas G heterotriméricas y tirosín-quinasa no receptoras.
- Inhibición de la apoptosis inducida por agentes quimioterápicos.
- Estimulación de la angiogénesis tumoral.
- Regulación del ciclo celular. Al parecer controlando el nivel de CDK, fundamentales para el paso de la fase Go a S (Leone et al.,1997).

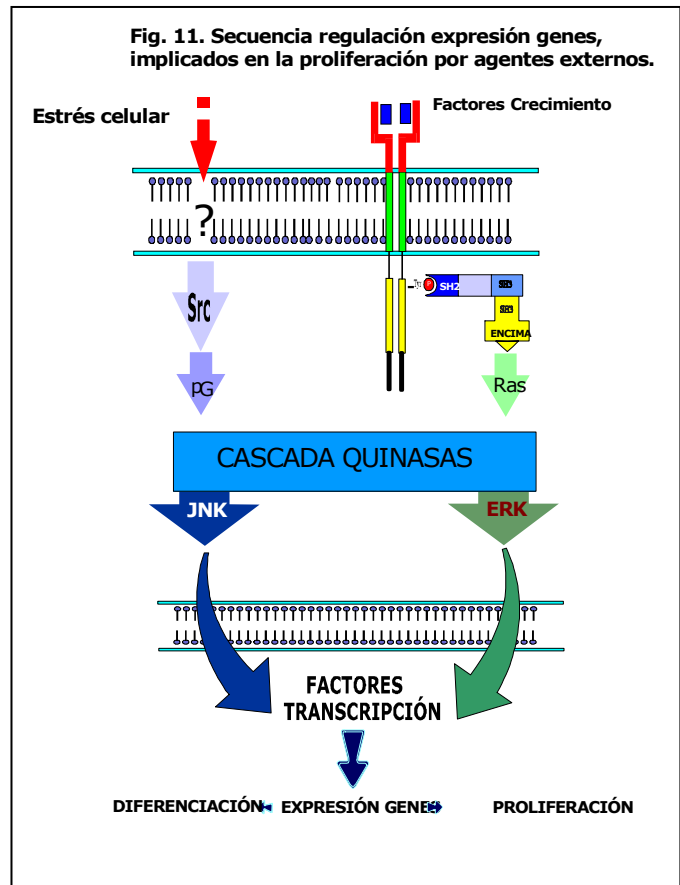


Ras, es una de las proteínas traductoras de la señal mejor estudiadas. Un 10-20% de todos los tumores humanos (40% en seminomas) presentan versiones mutadas de la proteína Ras (de Vries et al.,1996). La mutación del gen ras es la mutación única más común de los oncogenes dominantes en tumores humanos y además la superfamilia de proteínas G cuyo prototipo es Ras juega un papel importante en la carcinogénesis de tumores humanos inducida por factores de crecimiento.

Proto-oncogenes implicados en la transcripción génica

La regulación de la transcripción de los proto-oncogenes implicados en la proliferación celular, así como de otros muchos relacionados, representa el punto final de la transducción de la señal mitogénica.

Los proto-oncogenes nucleares, codifican proteínas localizadas normalmente en el núcleo celular. La función de estas proteínas es la regulación (activación o inhibición) de la expresión génica, actuando como factores de transcripción inducibles.



Los productos de los proto-oncogenes nucleares están regulados por todos aquellos agentes que estimulan la proliferación celular como: factores de crecimiento, agentes que inducen daño o estrés a las células (luz ultravioleta o agentes químicos que alteran la estructura del ADN), y también por algunas hormonas.

Proto-oncogenes myc.

En el núcleo se ha localizado un lote de oncoproteínas, entre ellas los productos de los oncogenes myc, myb, jun y fos. De ellos el, más frecuente, c-myc, se expresa en una gran variedad de cánceres humanos, como consecuencia de amplificaciones (Koskinen et al.,1993). Hay otros dos genes similares llamados S-myc y B-myc que, por el contrario, parecen inhibir la transformación maligna.

La proteína c- myc, que en realidad son dos proteínas: c- myc 1 y c- myc 2, se unen a la secuencia CACGTG (caja E) o a secuencias similares, formando heterodímeros con otra proteína denominada max, capaces de activar la transcripción génica.

Dado que myc necesita formar heterodímeros con max para su actividad, las proteínas mad tienen una acción inhibidora de myc mediante competición por la unión max. Ello convierte a los genes mad en candidatos a genes supresores de tumores (Desborats et al.,1996), hipótesis, que se ha visto recientemente apoyada por el descubrimiento de mutaciones del gen mx11 de la familia de mad, en algunos cánceres de próstata.

Genes supresores de tumores

Se conocen 30 de estos genes, de los cuales aproximadamente la mitad se han encontrado mutados o delecionados en tumores humanos. Nuestro conocimiento de su actividad es escaso, tienen importancia tanto en la aparición de tumores hereditarios como esporádicos. Los más importantes se relacionan en la tabla (Tabla 3).

De todos ellos, los más importantes y conocidos son el gen del retinoblastoma Rb y el gen P53, que se describen ampliamente en otros apartados

Tabla 3. Genes supresores de tumores.			
<i>Localización cromosómica</i>	<i>Gen supresor</i>	<i>Síndromes hereditarios ca.familiar</i>	<i>Cánceres esporádicos</i>
17p13	<i>P53</i>	Enf. Li-Fraumeni	Vejiga, mama hígado, colorrectal, pulmón, ovarios,etc
13q14	<i>Rb</i>	Retinoblastoma	Vejiga, retinoblastoma, mama, esófago, pulmón, sarcomas.
17q21	<i>BRCA1</i>	Cáncer mama, ovario	Ovario, mama
13q12	<i>BRCA2</i>	Cáncer mama	Uretra, mama, páncreas, colón útero, ovario
9p21	<i>MTS1</i>	Melanoma, páncreas	Vejiga, pulmón, gliomas, riñón, próstata, etc
17q11	<i>NF-1</i>	Neurofibromatosis tipo1 oEvR	Colón, astrocitomas
22q12	<i>NF-2</i>	Neurofibromatosis tipo2	Schwanomas, meningiomas,
5q21	<i>APC</i>	Poliposis adenomatosa familiar	Colorrectal, estomago y páncreas
5q21	<i>MCC</i>	¿	Colorrectal
18q21	<i>DCC</i>	¿	Vejiga, próstata,
	<i>JV18-1.</i>	¿	colorrectal, estómago,
	<i>DPCA</i>	¿	
11p13	<i>Wt1</i>	Tumor Wilms	Tumor Wilms
3p25	<i>VHL</i>	s.von Hippel-Lindau	Carcinoma células renales
9q,11q	¿	Esclerosis tuberosa	Angiomiolipoma renal, rabdomioma cardiaco.
1p, 14q, 17	¿	¿	Neuroblastoma
9p, 10	¿	¿	Glioblastoma
3p14	<i>FHIT</i>	¿	Pulmón
1q24-25	¿	próstata	próstata

Genes reparadores del ADN

En la célula normal, el ADN está bien conservado, ya que cualquier error en la secuencia de bases durante la replicación del ADN, es corregido por alguno de los sistemas de corrección de errores. Los genes encargados de la reparación del ADN, se agrupan en dos categorías.

GENES MMR (MISMATCH REPAIR), encargados de la reparación de los errores que se producen durante la replicación del ADN, por la formación de pares de bases erróneos. Entre los que destacamos: MSH2-3 o MRP1, MLH1, PMS1-2, GTBP.

GENES NER (NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR), reparación por escisión de nucleasas. Este sistema repara las lesiones del ADN inducidas por luz ultravioleta (elimina dímeros de timina), y por agentes químicos (rompe la unión covalente de los benzopirenos del tabaco con residuos de guanina (Muñoz, 1997).

Ciclo celular

La consecuencia final de todos los estímulos promotores del crecimiento es la entrada de la célula quiescente en el ciclo de división celular. Este ciclo celular está constituido por un periodo de tiempo destinado a la síntesis de ADN o fase S, necesario para duplicar la información genética, seguido por una fase M o mitosis en la que el ADN duplicado se reparte por igual entre sus dos células hijas. Antes de que la célula entre en fase S existe un periodo de tiempo para preparar la maquinaria enzimática que se requiere durante la síntesis de ADN y que se denomina G1. Del mismo modo existe otro intervalo antes de la fase M conocido como G2 en el que la célula se prepara para la iniciación de la mitosis. De esta forma el ciclo celular consta de cuatro fases G1, S, G2 y M. En términos citológicos la fase M es la única claramente diferenciable, de ahí en ocasiones se hable de ciclo celular como alternancia de fases M e interfases, donde la interfase engloba en conjunto G1, S y G2 (Solé-Balcells et al.,1995; Muñoz, 1997).

Regulación del ciclo celular

La progresión ordenada de las células a través de las distintas fases del ciclo celular se ejerce mediante enzimas denominadas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que forman complejos unas con otras (ciclinas-CDK), y sus inhibidores CDKI (Nurse, 1990; Reed, 1992; Murray et al., 1993).

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), son quinasas, que conducen el ciclo celular mediante la fosforilación de proteínas diana críticas, necesarias para la progresión de la célula a la siguiente fase del ciclo celular. Se expresan durante el ciclo celular pero en forma inactiva. Son activadas también por fosforilación, después de unirse de forma reversible, a otra familia de proteínas denominadas ciclinas.

Las ciclinas, en contraste con las CDKs, son sintetizadas durante fases específicas del ciclo celular, y su función es activar las CDKs; una vez que esta misión se ha cumplido, los niveles de ciclinas descienden rápidamente. Las oscilaciones en las concentraciones de ciclinas son críticas, existiendo un ciclo de síntesis y de degradación durante cada ciclo de división. Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs, cuya actividad fosforilando determinadas proteínas, dirige el avance del ciclo celular.

Los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs), al contrario de las ciclinas, silencian a los CDKs, ejerciendo otro nivel de control sobre el ciclo celular. Los CDKIs son proteínas que al unirse con los complejos ciclina-CDK inhiben directamente la actividad quinasas. Distinguimos dos tipos de CDKIs que se diferencian en estructura, mecanismo inhibitorio y especificidad:

- *Proteínas p21*(gen WAF.1)-*p27*(TGF-B1)-*p57*.
- *Proteínas p15, p16, p18, p19. p16 y p15* tienen efectos más selectivos sobre las ciclinas D/ CDK4-6.

Los CDKIs, como bloquean el ciclo celular, puede considerarse, que actúan como supresores de tumores, en especial las proteínas p16, p15, p21.(Fig. 12)

Otro nivel de regulación del ciclo celular es mediante la fosforilación/desfosforilación de las CDKs. El ciclo celular está controlado en varios puntos de control o de restricción, donde se evita el paso a la fase siguiente, si se demuestra algún defecto en la fase anterior.

Punto de control de restricción R o transición de G1-S:

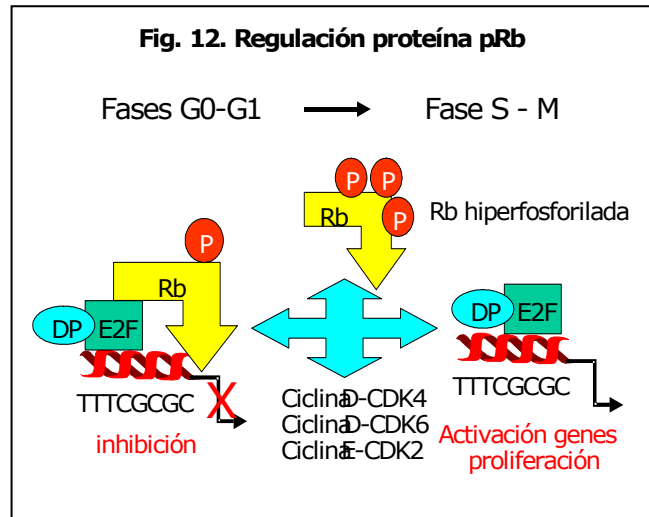
En este punto la célula comprueba que ha generado la masa suficiente para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN y, también, que las condiciones ambientales son favorables: presencia de nutrientes, sales, temperatura adecuada y de factores que induzcan crecimiento actuando sobre receptores de la membrana celular. Aunque cada fase del ciclo celular es cuidadosamente monitorizada, el punto de control y decisión más importante es el punto R o de transición de la fase G1 a S, pues una vez que la célula pasa de este punto está comprometida a progresar en la fase S (Sherr, 1996).

Cuando la célula recibe las señales promotoras del crecimiento, y en momentos iniciales de la fase G1, se produce un estímulo de la síntesis de ciclinas de tipo D (llamadas D1, D2, D3). La mayoría de las células expresan la D3, D1 y D2. Tienen una vida media muy corta (25 minutos) regulándose sus niveles por transcripción de los genes ya mencionados. Las ciclinas D se unen a varias CDKs: CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6. En los momentos iniciales de la fase G1, se unen a las CDK4-6. Al final de G1, comienza la síntesis de ciclinas tipo E, que forma complejos con la CDK2, que están implicados en el inicio de la fase S, es decir, en la replicación del ADN. Su síntesis continua hasta entrada en fase S, siendo entonces rápidamente degradadas.

La misión de los complejos formados por ciclinas tipo D con CDK4-6 y ciclinas tipo E con CDK2, es fosforilar la proteína Rb (producto del gen supresor de tumores Rb) y activar así la expresión de genes necesarios para la entrada en fase S, permitiendo el paso de fase G1 a S, sobrepasando el punto de transición G1-S.

La proteína pRb es fosforilada específicamente en la transición G1-S, y permanece así hasta el final de la fase M. Si pRb está hipofosforilada, se une e inhibe a varias proteínas, entre ellas algunos factores activadores de la transcripción, como E2F, que controlan la expresión de genes críticos

(myc) para la síntesis de ADN (ADN polimerasa, timidina quinasa, dihidrofolato reductasa y muchos otros), bloqueándose así la progresión celular y manteniendo las células en fase G1.



Tras su fosforilización al final de la fase G1, pRb ya no es capaz de unirse y bloquear a estos factores activadores, con lo que pRb se libera del factor E2F, este actúa sobre el oncogén myc, y se posibilita la transcripción y la replicación del ADN así como la entrada de la célula en fase de síntesis (fase S) (Fig.12). Si la ciclina D se expresa permanentemente, sin necesidad de factores de crecimiento, ocasionaría la hiperfosforilación permanente de Rb, liberación permanente del factor E2f, lo que acelera la entrada en fase S por lo que las células tienen tendencia a mantenerse en un ciclo de división constante. De ahí que aún considerada un oncogén, por si sola no es capaz de transformar una célula normal en cancerosa, colabora con otros oncogenes (Muñoz, 1997).

La sobreexpresión de la ciclina E, provoca, un moderado aumento de la entrada en fase S, pero si ambas ciclinas, D y E son sobreexpresadas sí se produce un incremento importante de la transición de G1 a S, lo que sugiere que los complejos ciclinas D-CDK y ciclinas E-CDK regulan aspectos distintos de esta transición. Algunas células tumorales expresan niveles elevados o formas mutadas de la ciclina.

El control en este punto se ejerce mediante la acción de dos genes, el gen del retinoblastoma (RB) y el gen p53.

El gen del retinoblastoma (Rb) se encuentra localizado en la banda 14 del cromosoma 13 (13q14) (Knudson, 1971) y codifica una proteína de 110 aminoácidos (p110 RB), que sufre cambios en su estado de fosforilación a lo largo del ciclo celular, siendo estos cambios en su estado de fosforilación lo que regula su actividad, como hemos visto. Existe un grupo de genes y sus proteínas que inhiben la fosforilación de pRB, inactivándola, entre los cuáles destacamos las proteínas p16, p21 y p27 productos de los genes MTS.1, WAF.1 y TGF-B.1 respectivamente.

El gen supresor de tumores p53 y su proteína p53, salvaje o nativa, son los otros reguladores del punto G1-S. Este gen se encuentra en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 17 (17p13), contiene 11 exones y codifica una proteína de 393 aminoácidos y 53 kb (p53 salvaje), que da lugar a un RNA m de 2,5 kd que es quien produce la proteína p53, llamada así por tener una longitud de 53 kd.

La p53 se acumula en el citoplasma celular durante la fase G1 y penetra en el núcleo, si no existe lesión del ADN, durante unas tres horas, para permitir la replicación del ADN. Luego se acumula de nuevo en el citoplasma. Si existen errores en el ADN, p53, bloquea el ciclo celular en fase G1 evitando el paso a fase S, para ello p53, pasa la célula a fase G0, y procediendo a la reparación del ADN, si esto no es posible, p53 desvía la célula al denominado fenómeno de apoptosis o muerte celular programada. Frente al gen p53 que actúa como un gen supresor de tumores, inductor de apoptosis, nos encontramos el gen bcl-2. El proto-oncogén myc, al ser estimulado por mitógenos o citoquinas, o como consecuencia de una mutación, o pérdida de un gen supresor de tumores, desencadena de forma simultánea apoptosis y proliferación celular, dependiendo del resultado final del nivel de bcl-2, capaz de inducir o inhibir el número de células en apoptosis.

El gen p53, es controlado a su vez por el gen mdm.2 (que codifica la proteína p90). La proteína p53 actúa sobre el gen WAF.1 (p21), que como hemos visto inhibe la fosforilación del pRB (correlación entre pRB y p53) (Fig.13)

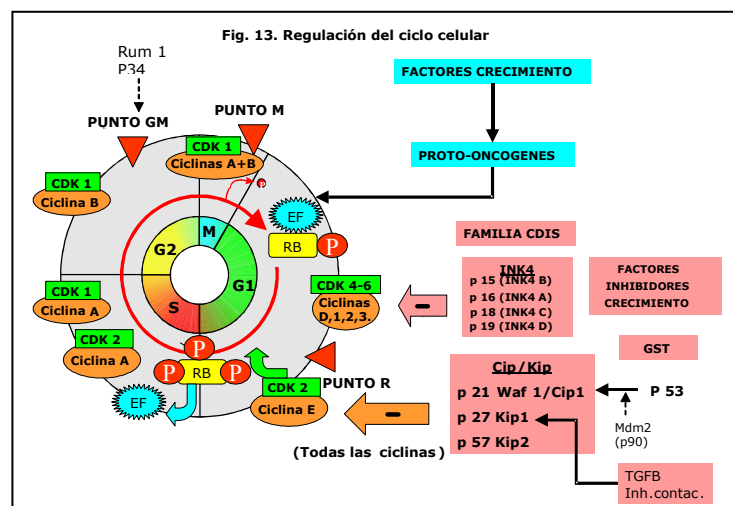
Punto de control G2-M.

En este punto la célula comprueba dos condiciones antes de dividirse: la duplicación de la masa para dar lugar a dos células hijas y que ha completado la replicación del ADN y que sólo lo ha hecho una vez.

Las ciclinas denominadas mitóticas, se unen a CDKs durante la fase G2 siendo esenciales para la entrada en mitosis. Hay dos ciclinas mitóticas A y B, que son estables durante la interfase, pero se degradan rápida y específicamente durante la mitosis. Las ciclinas B, con dos tipos B1 y B2, forman los complejos más importantes con la quinasa CDK1 (también llamada Cdc2, p34 o MPF factor promotor de la fase M (Dunphy et al., 1988). Algunos autores consideran a la ciclina B como una subunidad reguladora del factor promotor de la maduración (Richardson et al., 1989; Gautier et al., 1990). Los complejos ciclina B1/CDK1 se acumulan en el citoplasma durante la interfase y son rápidamente activados y translocados al núcleo al comienzo de la mitosis. Se asocian al huso acromático durante la metafase. La ciclina B se degrada en la transición metafase-anafase, causando la inactivación de CDK1. Esto parece ser necesario para la finalización de la mitosis, ya que las mutaciones en ciclinas B que evitan su degradación bloquean la célula en mitosis (Lewin, 1990).

Control mitótico o punto M

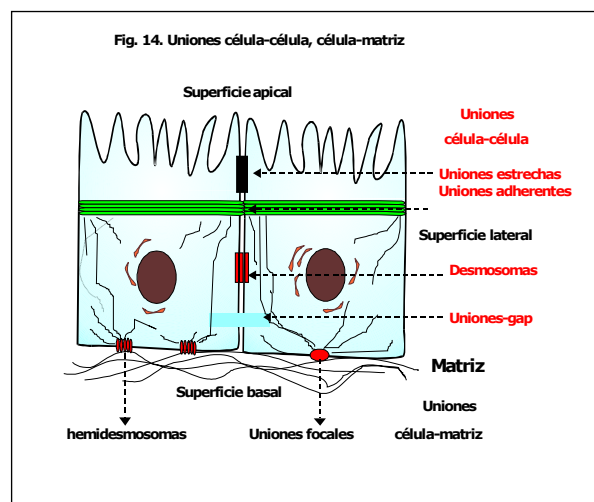
Entre metafase y anafase existe otro punto de control denominado M, cuya finalidad es permitir que el proceso siga adelante si no hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial; si esto es



así una señal externa desconocida causa que las cromátidas hermanas se separen, yendo cada una hacia un polo de la célula (Anafase). Este punto controla la degradación de la ciclina B1, pero aún es muy poco lo que se conoce de los mecanismos implicados. También han sido identificadas otras ciclinas C, F, G cuyas acciones no han sido caracterizadas (Muñoz, 1997).

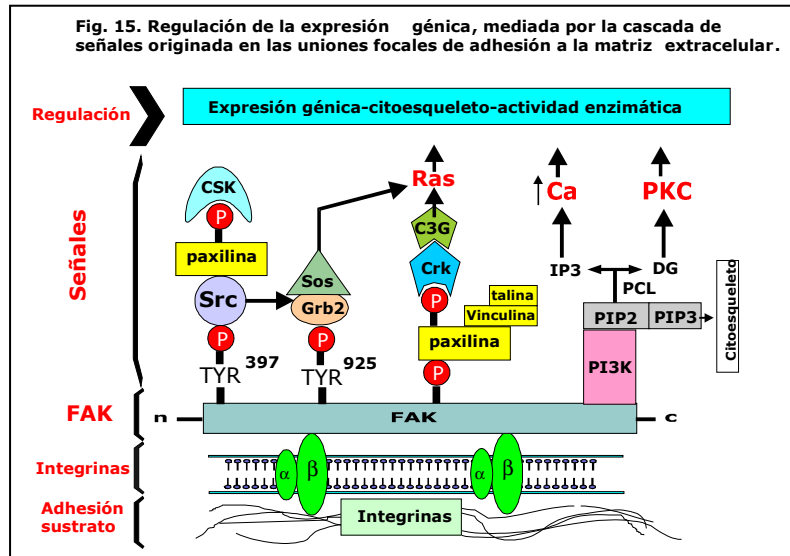
Adhesión celular

Las células epiteliales tienen como característica esencial la formación de



estrechas uniones intercelulares (uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y gap junctions) y su asociación con la matriz extracelular que frecuentemente se sitúa subyacente a ellas, mediante uniones focales (placas de adhesión) y hemidesmosomas (Fig.14). Está establecido que la formación y la conservación adecuada de las uniones intercelulares es imprescindible para el mantenimiento de la diferenciación de las células epiteliales, al contrario su desestabilización facilita la dediferenciación y adquisición de la capacidad invasiva.

Varios componentes de las estructuras de unión intercelular, en general proteínas como: cingulina, E-cadherineina, actina, cateninas y otras, parecen ser productos de genes supresores de tumores y, de modo opuesto, se ha demostrado que la mutación de varios proto-oncogenes (src, ras, fos, met, etc) desestabiliza dichas estructuras. Por esto las células invasivas de los carcinomas exhiben pocas uniones intercelulares, perdiendo las uniones estrechas con las células adyacentes. La pérdida de adhesividad



intercelular y su unión a la matriz extracelular es un requisito previo a su capacidad invasiva, necesario para la movilidad celular.

Varias proteínas codificadas por proto-oncogenes con actividad tirosín-quinasa como Src, Yes, PKC, Abl y el receptor EGF, se localizan en las uniones adherentes, y fosforilan las proteínas constituyentes de estas uniones. Esta fosforilación es la base de la función de las proteínas implicadas en la adhesión. Es posible que la fosforilación de β -catenina por Src inactive el sistema de adhesión E-cadherina-catenina. También la señal originada por el producto del proto-oncogén wnt-1 en la membrana parece tener efectos a este nivel. De manera análoga a las señales traducidas por los receptores de los factores de crecimiento, las integrinas actúan como receptores de la matriz extracelular, generando señales intracelulares que controlan la proliferación, la forma y el metabolismo celular (Fig 15).

Envejecimiento y muerte celular

Cuando una célula recibe la señal de proliferación por alguna de las vías que hemos visto, generalmente se divide hasta que llega a un punto de diferenciación óptimo en el que ha adquirido las características necesarias para realizar la función para la que estaba predestinada, teniendo en general una determinada capacidad intrínseca de proliferar (unas 50 divisiones).

Hoy se cree que el acortamiento en unos 50-200 nucleótidos, de los extremos de los cromosomas o telómeros (formados por centenares o miles de repeticiones de 6 nucleótidos TTAGGG en el hombre) que se produce en cada ciclo de división celular como consecuencia de la incapacidad de la ADN polimerasa de replicar los extremos de las moléculas lineales ADN, es parte del reloj celular que cuenta el número de divisiones. El cese de la división supone el paso final de un proceso de envejecimiento o senescencia celular.

Sin embargo, en algunas ocasiones la célula escapa a este proceso y se hace inmortal dividiéndose de forma infinita. Hoy sabemos que esto se produce por el acúmulo inicial de al menos dos mutaciones en los genes supresores Rb y p53, que en condiciones normales limitan la proliferación celular, y la expresión de una enzima denominada telomerasa.

La telomerasa, es una ribonucleoproteína formada por un ARN y múltiples proteínas, cuya función es extender los telómeros, evitando así el acortamiento sucesivo de los cromosomas. Sólo se expresa en células fetales y muy poco en células de tejidos adultos.

Recientemente, se ha descrito que existe un aumento de la actividad telomerasa en las fases finales de la progresión tumoral. Esta reactivación en células cancerosas puede ser necesaria para el crecimiento tumoral al impedir la muerte celular. Su mecanismo de acción no es conocido, pero es posible, que el ARN que tiene una secuencia complementaria a la de los telómeros, pueda ser utilizado como iniciador para la extensión de los extremos del ADN.

En sentido opuesto, se ha propuesto, que el progresivo acortamiento de los cromosomas en células que no expresan telomerasa puede favorecer un aumento de su inestabilidad y acarrear la acumulación de todo tipo de mutaciones; pérdida de genes supresores, aparición de aberraciones cromosómicas, etc. Se sabe que los cromosomas que han perdido los telómeros tienden a fusionarse, produciendo cromosomas dicéntricos que se distribuyen anormalmente durante la mitosis, dando lugar a células aneuploides, con dotación cromosómica distinta a la normal. Si esto fuese así, la

reactivación de la telomerasa contrarrestaría la malignización de las células cancerosas.

Las células no viven indefinidamente. En condiciones normales cada célula tiene una duración más o menos determinada. La muerte celular es, una más de las opciones que tienen las células: diferenciación terminal, perder el control de la división y originar cáncer. Tenemos dos tipos de muerte celular:

Necrosis celular

La muerte celular se produce por múltiples causas: daño mecánico, infección viral u otros microorganismos, agentes químicos tóxicos, acúmulo de material de deshecho, etc. En estos casos, las células se hinchan y sufren un deterioro de su estructura y organización, con cese de sus funciones y viabilidad, rotura de la membrana celular y lisis celular, saliendo material citoplásmico al medio, dando lugar a una reacción inflamatoria.

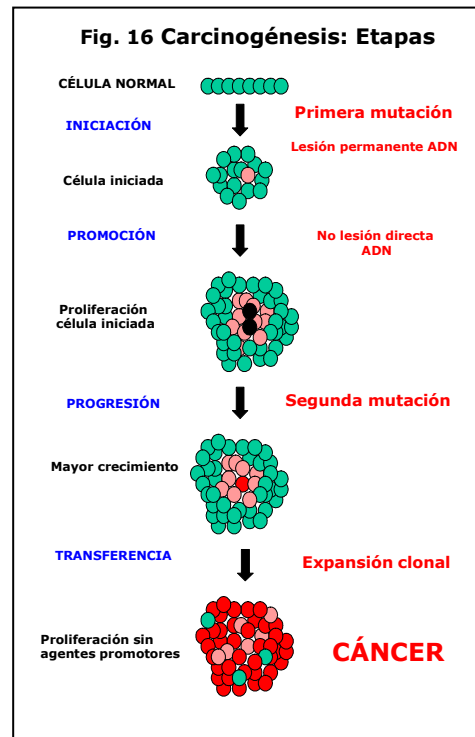
Apoptosis o muerte celular programada

Implica la activación de mecanismos específicos que terminan con la muerte de la célula. Se produce apoptosis de forma natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos; al parecer como mecanismo de eliminación de células superfluas en un lugar determinado. Durante el ciclo celular se produce apoptosis de forma natural cuando el ADN que va a ser replicado presenta aberraciones. El proceso tiene dos fases: Fase de determinación (la célula reacciona ante un estímulo, decidiendo iniciar el proceso de muerte), fase de ejecución (se producen alteraciones estructurales que conducen la célula a la muerte). Estas alteraciones son debidas a la activación de enzimas como proteasas y nucleasas. El fenómeno apoptótico, es relevante en la aparición de cánceres.

4.2 TRANSFORMACIÓN Y PROGRESIÓN NEOPLÁSICA

Los estudios realizados sobre sistemas experimentales de carcinogénesis química (Tennant et al., 1997; Weston et al., 1997), han permitido establecer una hipótesis secuencial del desarrollo neoplásico, por el cual el cáncer se desarrolla después de una secuencia concreta de pasos o fases (Teoría multifásica). Estas fases son:

- *Iniciación*. Se produce por la exposición de las células a una dosis apropiada de un agente carcinógeno (Iniciador). La célula iniciada, presenta un daño permanente en su ADN (mutación), que se produce de forma rápida, es irreversible y tiene memoria, es decir, se producirá un tumor aunque la aplicación de un promotor se produzca meses después de una única dosis del iniciador.
- *Promoción*. En esta fase, los agentes promotores, son incapaces de producir cáncer por si solos, pues tienen baja capacidad mutacional (no afectan directamente al ADN), pero si inducen una gran proliferación de las células iniciadas y por ello sus efectos son reversibles. Los agentes promotores han de ser sustancias relativamente comunes para que sea posible inducir una proliferación celular suficientemente grande, como para que después pueda progresar alguna célula. Los cambios producidos en la célula directos o indirectos, ocasionan cambios genéticos adicionales que afectan a la expresión del genotipo maligno (Cohen et al. 1991^a- 1991^b).
- *Progresión*. Fase en la cual la célula transformada, sufre una segunda mutación mediante cambios genéticos o epigenéticos, que la capacitan para un mayor crecimiento.

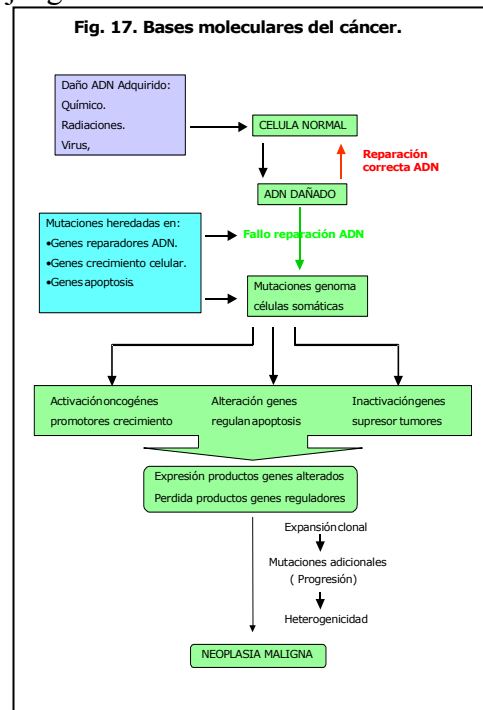


- *Transferencia.* En esta fase la célula maligna, resultante de la fase de progresión, puede proliferar sin la acción de agentes promotores, produciéndose una expansión del clon desarrollado (Fig.16).

Los distintos pasos teóricos de la transformación maligna celular experimental, son alterados en el paciente, donde entran en juego otras variables como:

La sensibilidad anormal a carcinógenos exógenos o endógenos. También el microambiente que rodea a las células del epitelio transicional, puede afectar la sensibilidad a carcinógenos, facilitando el desarrollo de diferentes alteraciones genéticas por insultos químicos relativamente parecidos.

Los cánceres se producen cuando el crecimiento celular excede a la muerte celular, ya sea por aumento de las células en proliferación, por disminución del número de células que mueren, o por ambos procesos a la vez (Fig. 17).



Como sabemos para que una célula que ha sufrido los pasos antes descritos, desarrolle completamente el fenotipo neoplásico, es necesario que además del crecimiento excesivo, adquiera la capacidad de invadir estructuras cercanas, diseminarse a distancia y crecer en los lugares donde asienta, es decir, metastatizar. Liotta et al (1986), describió los pasos necesarios que las células tumorales tienen que dar para metastatizar: Romper la membrana basal – Penetrar dentro de la matriz extracelular – Sobrevivir en la circulación sanguínea – Sembrarse en lugares distantes, Solé-Balcells et al (1995), denomina a todos estos cambios, cambios post carcinogénesis.

Para que la célula neoplásica pueda iniciar la invasión de la estructura inmediata, la membrana basal, que en el caso de los epitelios, es la matriz extracelular, se tienen

que producir una serie de hechos, que se desarrollan en una fase precoz del crecimiento del tumor primario:

Pérdida de la adherencia intercelular, desprendiéndose de sus células vecinas. En este proceso se produce:

- La disminución de la expresión de proteínas de adhesión celular como E-cadherina y cateninas o alfa-actina, lo que causa una menor adhesión a las células vecinas. Al contrario, la sobreexpresión de E-cadherina, cateninas y alfa-actina reduce la invasividad de las células tumorales, demostrando que E-cadherina actúa como un supresor de la invasividad tumoral (Muñoz, 1997).
- Inactivación o disminución de distintas integrinas. Sin embargo la expresión de la integrina α -6 aumenta en el cáncer vesical (Muñoz, 1997).
- Sobreexpresión de la quinasa Fak, implicada en las uniones focales, permite sobrevivir a la muerte por apoptosis a las células epiteliales humanas en ausencia de contactos con la matriz celular, y se correlaciona con la capacidad de metastatizar de varios tipos de células tumorales; en contra, su supresión causa muerte por apoptosis (Muñoz, 1997)
- Genes cuyos productos se relaciona con la adhesión celular, como el gen CD44, y en especial el CD44v6, puede tener un papel importante en el desarrollo de metástasis. Este gen codifica varias proteínas, receptoras del ácido hialurónico (HA), muy abundante en tejido conectivo de epidermis, lámina propia de membranas mucosas, adventicia de los vasos y membrana de algunas células. Las células tumorales invasoras, contienen más HA que las normales, por propia secreción o por aumento de la producción de los fibroblastos adyacentes inducida por distintos factores. También se ha correlacionado sus niveles elevados en suero de pacientes con cáncer metastásico, demostrando la agresividad tumoral, facilitando la movilidad celular o el proceso de angiogénesis (Muñoz, 1997).
- Las tenascinas (C-R-X-Y), (glicoproteínas secretadas por las células de la matriz extracelular) y en especial la tenascina-C, se expresan en varios tejidos durante el desarrollo embrionario, pero no en el adulto, aumentando en los procesos cancerosos, por secreción de las células tumorales, células estromales y del endotelio vascular.

Está regulada por factores de crecimiento y distintas hormonas. Parece tener un papel en la invasividad tumoral disminuyendo la capacidad de adhesión celular y estimulando la angiogénesis a nivel del endotelio vascular (Muñoz, 1997).

Adherirse a la membrana basal. Mediante receptores periféricos, localizados en la membrana celular, las células se unen a componentes específicos de la matriz extracelular (laminina y fibronectina). La laminina es una glicoproteína que se localiza predominantemente en la membrana basal donde se une con el colágeno tipo IV. Altas concentraciones de receptores para laminina han sido identificados en varias líneas celulares neoplásicas (Liotta et al., 1985). Alteraciones de los receptores de laminina para unirse a la matriz han sido asociadas con una disminución de la capacidad metastásica en modelos de melanoma (Barsky et al., 1984). Las células normales también tienen receptores para laminina pero su número es menor que en las células tumorales (Liotta, 1986).

Degradación de la matriz extracelular. Tras unirse a la matriz extracelular, las células tumorales, secretan proteasas, enzimas, que destruyen la matriz extracelular. El aumento de la actividad proteolítica se produce por el incremento de la expresión y secreción de proteasas, así como por la disminución en la producción de inhibidores de estas. Se ha visto una buena correlación entre la agresividad tumoral y el nivel de determinadas proteasas que destruyen los distintos tipos de colágeno, la fibronectina, la laminina, los proteoglicanos y otros componentes del tejido conectivo, y de la membrana basal del epitelio. Se conocen varios tipos de proteasas.

La expresión de las MMPs (Matrix Metallo Proteinases) está inducida por factores de crecimiento (EG, PDGF, TGF-alfa, bFGF), citoquinas (IL-1 y TNF-alfa), y sobreexpresión del gen ST-1. Las proteasas pueden ser inhibidas por TIMP-1,2,3, (Tissue Inhibitor of Metallo Proteinases), PAI 1 y 2 (Plasminogen Activator Inhibitor) y TGF-beta y IL-4. Estas sustancias inhiben la invasividad de las células tumorales in vitro en animales y quizás en el hombre.

La actividad proteolítica se ejerce fundamentalmente en el área pericelular para eso, tanto las proteasas como sus inhibidores se localizan en las regiones de adhesión o

en las protusiones con las que las células avanzan a través de la matriz. Todo esto indica

la importancia en la invasión tumoral de la actividad proteolítica de las células tumorales o las estromales que las rodean. El fenotipo invasor parece ser el resultado entre el equilibrio de las proteasas y sus inhibidores.

Movimiento de las células tumorales a través de la matriz extracelular atenuada. Las células tumorales invasivas y metastásicas manifiestan una mayor movilidad que las células normales (Mohler et al., 1987; Partin et al., 1988). Esta movilidad es necesaria para alcanzar los vasos sanguíneos y diseminarse a distancia. Por lo tanto, la invasividad tumoral es el resultado de ciclos dinámicos de adhesividad, degradación de la matriz, movimiento celular y adhesión al nuevo sustrato (Muñoz, 1997).

Transformación del cáncer localmente invasor en metastásico. El que la célula tumoral haya alcanzado el tejido intersticial, gracias a su capacidad invasora, no es suficiente para dar lugar a metástasis y serán precisos otros mecanismos y la adquisición de otras capacidades para que estas células puedan dar lugar a tumores secundarios en otros tejidos. Para esto se tienen que producir mutaciones genéticas que le permitan a las células tumorales la adquisición de nuevas capacidades, necesarias para poner en marcha tres mecanismos fundamentales para producir metástasis, como son:

- La angiogénesis o la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.
- Evadir la respuesta del sistema inmune.
- Formación de tumores secundarios en otros tejidos (metástasis).

La angiogénesis tumoral es un proceso complejo que implica varios pasos, como: remodelación de la adventicia por degradación proteolítica, proliferación de células endoteliales y emigración de células endoteliales para formar nuevos capilares en dirección a la masa tumoral.

La capacidad angiogénica, adquirida por el tumor en fases tempranas del fenotipo tumoral, es esencial para el desarrollo del tumor. El proceso angiogénico es

fundamental tanto al principio de la vida del tumor como al final; al principio permite a las células cancerosas invadir el torrente circulatorio y ganglios linfáticos (no por

angiogénesis linfática), lo que favorecerá su diseminación y al final cuando la célula haya podido vencer la inmunidad del huésped, atravesar los vasos sanguíneos y colonizar en tejidos distantes, para poder iniciar el crecimiento de nuevos tumores secundarios. La invasión de los vasos sanguíneos se puede producir por que la célula tumoral degrada la adventicia de los vasos sanguíneos o linfáticos que se encuentra a su paso, atraviesa su pared y penetra en el torrente sanguíneo o linfático o lo que es más frecuente, induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos. Las células con más capacidad metastática son las células capaces de inducir angiogénesis. Hay una correlación significativa entre la incidencia de metástasis y el número de microcapilares. La mayor densidad de vasos es un factor pronóstico significativo en algunos carcinomas. (Wiedner et al., 1993).

El hecho de que algunas micrometástasis permanezcan silentes durante años y después de forma brusca se produzca una expansión tumoral es debido a un estímulo angiogénico. Esto orienta a la existencia de factores activadores de la angiogénesis, existiendo también factores inhibidores de esta. La existencia de estos factores inhibidores se apoya también en la experiencia de que cuando se elimina el tumor primario las metástasis aparecen, indicándonos que el tumor primario puede producir factores inhibidores de la angiogénesis.

Dentro del torrente sanguíneo la célula tumoral deberá sobrevivir al sistema inmune, después adherirse a la pared de un vaso, en una región distante atravesar otra vez su pared y extravasarse. No todas las células que alcanzan el torrente circulatorio sobreviven, solo un 1% de las células inyectadas en el torrente circulatorio mantienen su viabilidad solo el 0,05% de las células que alcanzaron la circulación sanguínea son capaces de establecer metástasis (Fidler, 1990). El significado clínico del pequeño número de células tumorales detectadas en la circulación tiene aun que ser establecido, se necesitan nuevos métodos para detectar el potencial biológico de las células tumorales circulantes (Heston, 1995).

5. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL MELANOMA UVEAL

Aproximadamente, el 40% de los pacientes con melanoma uveal posterior que sufren enucleación desarrollan melanoma metastásico en el hígado después del diagnóstico inicial (Shields et al., 1991). Clínicamente, es infrecuente la evidencia de enfermedad metastásica en el momento de la presentación inicial, aunque existen sospechas de que en la mayoría de los casos existen metástasis incipientes subclínicas (Shields et al., 1991). Utilizando métodos convencionales (enzimas hepáticas en suero, ecografía...) la enfermedad metastásica puede ser detectada en solamente 1-2% de los pacientes en el momento de la presentación (Donoso et al., 1985). Se han propuesto protocolos de cribado sistemático (mediante exámenes físicos, pruebas de función hepática, radiografía de tórax y estudios de imagen hepática, cada 6 meses a 1 año), pero su efectividad no ha sido todavía demostrada (Eskelin et al., 1999).

Para reducir la mortalidad específica por el melanoma uveal, recientemente se ha intentado el tratamiento de pequeñas lesiones melanocíticas coroideas que tienen un riesgo significativo de crecimiento, lo cual sugiere transformación en melanoma (Shields et al., 1995). Desde 1995, con la disponibilidad de la termoterapia transpupilar (una modalidad de tratamiento no invasivo) se ha hecho posible tratar los tumores más pequeños con pocas complicaciones (Oosterthuis et al., 1995; Shields et al., 1998). Se piensa que el tratamiento de pequeñas lesiones melanocíticas coroideas redundará en una mayor supervivencia a largo plazo, pero esta suposición todavía no ha sido demostrada.

La investigación de los factores pronósticos del melanoma uveal es importante para el manejo del paciente y para comprender los procesos biológicos que influyen en la capacidad de los tumores para metastatizar hematógicamente (McLean, 1995). Gamel et al. (1993) desarrollaron un modelo estadístico y McLean (1991) utilizó este modelo para describir las metástasis del melanoma de úvea. El modelo de Gamel-Boag puede ser empleado para relacionar mejor las características pronósticas con los mecanismos biológicos de las metástasis hematógenas (McLean, 1995).

El pronóstico del melanoma uveal depende principalmente de sus características clínicas e histopatológicas. Muchas de las características investigadas acerca de su valor pronóstico presentan limitaciones: 1º) se han mostrado significativas sólo en unos pocos estudios, con un tamaño de muestra relativamente pequeño (menos de 200 pacientes); 2º) han originado resultados contradictorios; 3º) aparecen tan infrecuentemente que la significación clínica es baja o 4º) han sido rechazadas al resultar no significativas en estudios que emplean un estudio estadístico multivariable.

Sirva de ejemplo, en este sentido, la edad como factor pronóstico en el melanoma uveal. La edad del paciente afecta a un amplio rango de factores del huésped. Los procesos tanto hormonales como inmunológicos pueden estar afectados. Al envejecer los pacientes, las tasas de supervivencia del melanoma uveal disminuyen (Gamel et al., 1992). No obstante, en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que comparan pacientes jóvenes y viejos, las tasas de supervivencia a largo plazo son similares. Esto sugiere que la tasa de cura para los dos grupos es similar y que la diferencia en la supervivencia es debida a que los pacientes de edad avanzada con melanoma uveal metastásico mueren más rápidamente por otras circunstancias.

5.1 Factores pronósticos clínicos

Los factores pronósticos clínicos relacionados con el pronóstico incluyen: localización del tumor, tamaño del tumor, configuración del tumor y método de tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4 . Factores pronósticos clínicos en el melanoma uveal

<i>Categoría</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Seguimiento</i>	<i>Resultados (%)</i>	<i>Primer autor</i>	<i>Año</i>
<i>Localización</i>	<i>Iris</i>	Mortalidad 10 años	6	Rones	1958
		Mortalidad 10 años	5	Shields	2000
	<i>Cuerpo ciliar</i>	Mortalidad 5 años	53	Seddon	1983
		Mortalidad 5 años	22	Gunduz	1999
	<i>Coroides</i>	Mortalidad 5 años	14	Seddon	1983
	<i>Tamaño</i>	<i>Pequeño</i>	Mortalidad 5 años	16	Diener-West
Mortalidad 5 años			3	Shields	1995
Mortalidad 5 años			1	COMS	1997
<i>Mediano</i>		Mortalidad 5 años	32	Diener-West	1992
<i>Grande</i>		Mortalidad 5 años	53	Diener-West	1992
<i>Configuración</i>		<i>Difuso</i>	Mortalidad 5 años	24	Shields
<i>Tratamiento</i>	<i>Enucleación</i>	Mortalidad 8 años	38	Augsburger	1989
	<i>Placa</i>	Mortalidad 8 años	24	Augsburger	1989
	<i>Placa e ión helio</i>	Mortalidad 5 años	24	Kroll	1998
	<i>Haz de protones</i>	Mortalidad 5 años	19	Seddon	1990

Localización del tumor

Los melanomas del iris (3% de los casos) son generalmente anteriores y relativamente pequeños cuando son diagnosticados y tratados (Jensen et al., 1970). Tienen la mortalidad más baja: 3-5% en 10 años (Rones et al., 1958). Esto puede deberse al hecho de que estos tumores son relativamente pequeños cuando son diagnosticados y de ahí que tengan tipos celulares menos agresivos cuando se comparan con los melanomas de la úvea posterior (Davidfor, 1981; Jensen, 1993).

Rones y Zimmerman (1958) comunicaron una mortalidad del 6% a los 10 años en los melanomas del iris. Posteriormente, en una gran serie (3.432 casos) de melanoma uveal de la misma institución, McLean et al. (1982) advierten una mortalidad 10 veces más baja en el melanoma del iris que en el melanoma del cuerpo ciliar y de coroides. Más recientemente, éstos autores identificaron los factores de riesgo de metástasis; y así, usando el método analítico de Kaplan-Meier, las metástasis

se apreciaron en el 3% a los 5 años, 5% a los 10 años y 10% a los 20 años; los factores clínicos estadísticamente significativos predictivos de metástasis subsecuentes en el melanoma del iris incluían: edad al diagnóstico, presión intraocular elevada, extensión del tumor posteriormente, extensión extraocular e intervención quirúrgica previa.

El melanoma del cuerpo ciliar tiene un peor pronóstico (Seddon et al., 1983). En una serie de 267 pacientes con melanoma uveal tratados mediante enucleación, la mortalidad a los 5 años por melanoma del cuerpo ciliar fue del 53% y del 14% en el melanoma coroideo. De los 136 pacientes con melanoma del cuerpo ciliar tratados con placas radioactivas, el análisis Kaplan-Meier mostró una mortalidad del 22% a los 5 años (Gunduz et al., 1999). La media de tiempo para desarrollar metástasis fue de 68 meses (con una variación de 25 a 178 meses). El único predictor de metástasis era el grosor tumoral superior a 7 mm, los cuales eran 2,5 veces más propensos a desarrollar metástasis que los pacientes con melanoma de cuerpo ciliar más fino. Aunque los melanomas del cuerpo ciliar suelen ser de mayor tamaño que los melanomas coroideos en el momento del diagnóstico, se ha observado estadísticamente que el pronóstico es peor para los melanomas de cuerpo ciliar independientemente del tamaño y tipo celular de la neoplasia (Seddon et al., 1983; McLean et al., 1987).

Tamaño del tumor

Se han utilizado varios métodos para establecer el tamaño del tumor (McLean et al., 1982; Seddon et al., 1983; Gunduz et al., 1999; McLean et al., 1977; Shammas et al., 1977; Jenses et al., 1963), tales como: diámetro mayor del tumor (Seddon et al., 1983), volumen tumoral (McLean et al., 1977) y el área de la base tumoral (Jensen et al., 1963). En un meta-análisis de ocho publicaciones con índices de mortalidad del melanoma uveal tras enucleación, los melanomas de la úvea fueron clasificados en tres grupos por su diámetro y altura; la estadística media combinada de los índices de mortalidad a los 5 años fue del 16% para los tumores “pequeños”, 32% para los tumores “medianos” y 53% para los tumores “grandes” (Diener-West, 1992).

Como ya ha sido señalado en otro apartado, el melanoma coroideo “pequeño” puede ser clínicamente indistinguible del nevus coroideo. Por ello la actitud terapéutica en los tumores melanocíticos coroideos pequeños constituye un aspecto controvertido. En un gran estudio retrospectivo de 1.329 de lesiones melanocíticas coroideas pequeñas (que median menos de 3 mm de grosor) el 3% de los pacientes desarrollaron metástasis a los 5 años (Shields et al., 1996). Los factores predictivos de metástasis incluyeron: proximidad del tumor al disco óptico, crecimiento documentado del tumor y mayor grosor tumoral. En un estudio prospectivo no-randomizado de 204 melanomas coroideos “pequeños” (es decir, con altura de 1-3 mm y diámetro de 5-16 mm), la mortalidad por melanoma a los 5 años fue solamente del 1%, indicando los bajos índices de mortalidad en los melanomas coroideos pequeños (Anónimo, 1997).

Configuración del tumor

La forma del melanoma uveal puede variar desde una lesión relativamente plana-difusa hasta un tumor redondeado; algunos tumores penetran a través de la membrana de Bruch y adquieren una forma “en champiñón”. Pues bien, la presencia de infiltración de la membrana de Bruch no constituye un factor pronóstico (Seddon et al., 1983; Shamma et al., 1977). Por otro lado los melanomas coroideos difusos tienen mal pronóstico (Diener-West, 1992); y así, en un estudio de 111 melanomas coroideos difusos, la mortalidad a los 5 años en estimación de Kaplan-Meier fue del 24%; los factores clínicos predictivos de metástasis incluyeron: diámetro de 18 mm o más, invasión del nervio óptico y bordes/márgenes mal definidos (Shields et al., 1996). El mal pronóstico en el melanoma coroideo difuso puede ser atribuido al retraso en el diagnóstico correcto, a la mayor proporción de células epiteloideas y a su tendencia a la extensión extraocular (Shields et al., 1996; Font et al., 1968).

Método de tratamiento

Zimmerman et al. (1979) comunicaron sus observaciones sobre la elevación del índice de mortalidad unos cuantos años después de la enucleación. Estudiando 2.300 casos, la mortalidad postoperatoria aumentó respecto al índice estimado antes de la

enucleación desde un 1% al año hasta un pico del 8% tras la enucleación, descendiendo a partir de entonces. Estos autores postularon que la enucleación tenía un efecto nocivo respecto a las expectativas del curso natural de la enfermedad (Zimmerman et al., 1978; Zimmerman et al., 1979).

En estudios retrospectivos, los índices de mortalidad son similares en el melanoma uveal de un determinado tamaño comparando los tratados por enucleación, de los que recibieron otro tipo de terapéutica: placa radioterápica (Augsburger et al., 1989), radioterapia con haces de protones (Seddon et al., 1990) o terapia con iones de helio (Kroll et al., 1998).

El COMS está llevando a cabo un estudio prospectivo de la supervivencia de los pacientes con melanoma de coroides (Straatsma et al., 1988). En cuanto al diseño de este estudio, los melanomas reales han sido clasificados en tres categorías (“pequeño”, “mediano” y “grande”); los tumores más pequeños que la dimensión de un melanoma coroideo “pequeño” han sido denominados nevus coroides. Los objetivos de este estudio básicamente son: 1) ensayo “randomizado” de pacientes con melanoma coroideo “mediano” tratado con enucleación versus irradiación con placa de I^{125} ; 2) ensayo “randomizado” de pacientes con melanoma coroideo “grande” tratados con enucleación solamente versus y radiación externa pre-enucleación y enucleación (Anónimo, 1997) y 3) estudio observacional prospectivo de los pacientes con melanoma coroideo “pequeño” (Anónimo, 1998).

5.2 Histopatológicos

Valorando detalladamente los aspectos histopatológicos del tumor en casos enucleados, se ha apreciado que los predictores significativos de supervivencia son los siguientes: tipo celular, actividad divisional de las células, arquitectura de la microcirculación (patrones vasculares), infiltrado lifocitario asociado y presencia de extensión extraescleral (Tabla 5).

Tabla 5 . Factores pronósticos histopatológicos en el melanoma uveal

<i>Categoría</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Seguimiento</i>	<i>Resultados (%)</i>	<i>Primer autor</i>	<i>Año</i>
<i>Tipo celular</i>	<i>Fusiforme</i>	Mortalidad 15 años	20	McLean	1982
	<i>Mixto</i>	Mortalidad 15 años	60	McLean	1982
	<i>Epitelial</i>	Mortalidad 15 años	75	Shammas	1977
<i>Actividad mitótica</i>	<i>Baja</i>	Mortalidad 6 años	16	McLean	1977
	<i>Media</i>	Mortalidad 6 años	32	McLean	1977
	<i>Intensa</i>	Mortalidad 6 años	53	McLean	1977
<i>Vascularización</i>	<i>Ausente</i>	Mortalidad 10 años	10	Folberg	1993
	<i>Presente</i>	Mortalidad 10 años	50	Folberg	1993
<i>Infiltrado linfocitario tumoral</i>	<i>Escaso</i>	Mortalidad 15 años	30	De la Cruz	1990
	<i>Intenso</i>	Mortalidad 5 años	62	De la Cruz	1990
<i>Extensión extraescleral</i>	<i>Ausente</i>	Mortalidad 10 años	37	Seddon	1983
	<i>Presente</i>	Mortalidad 10 años	75	Seddon	1983

Tipo celular

En 1931, Callender propuso una clasificación del melanoma uveal basado en el tipo celular. Esta clasificación fue posteriormente modificada -entre otros- por McLean et al. (1983), mejorando la correlación entre el tipo de células proliferantes y la mortalidad; y así: a) muchos de los tumores fusocelulares A fueron reclasificados como tumores benignos porque no producían la muerte del paciente; b) los melanomas fusocelulares tenían el mejor pronóstico, los epiteloides el peor y las formas mixtas tenían un pronóstico intermedio (McLean et al., 1977). La mortalidad específica por melanoma a los 15 años en pacientes con melanoma de tipo celular mixto fue tres veces mayor que la que originaban los melanomas de células fusiformes. Los tumores clasificados como de celularidad mixta varían en la proporción de células epiteloides (McLean, 1983), siendo el pronóstico peor en los melanomas uveales con celularidad mixta que contienen abundantes células epiteloides (Seddon et al., 1983).

Puesto que la caracterización del tipo celular es bastante subjetiva se han propuesto criterios morfométricos (Gamel et al., 1992). El área nucleolar es mayor y pleomórfica en las variantes más malignas de melanoma uveal, y así se ha comprobado al advertir que la desviación estandar del área nucleolar (como medida del pleomorfismo nucleolar) es pronósticamente significativa (Seddon et al., 1987). Sin embargo, la medida de este parámetro requiere un equipamiento especializado y precisa bastante tiempo para realizarla; por ello, se ha acudido a la medida de la media de los diámetros de los 10 nucleolos mayores, como un método más simple y que proporciona similar información pronóstica (Gamel et al., 1992).

Actividad mitótica

La actividad mitótica (determinada microscópicamente por el número de mitosis vistas por campos de gran aumento/CGA), ha demostrado tener valor pronóstico en algunos estudios. En uno de ellos (McLean et al., 1983), los tumores con baja actividad mitótica (0-1/CGA) tenían un buen pronóstico, con mortalidad a los 6 años del 15%, comparada con el 56% de mortalidad que se advertía en tumores con elevada actividad mitótica (9-48/CGA).

Arquitectura de la microcirculación (patrones vasculares)

Recientes estudios han demostrado que la arquitectura de la microcirculación (patrones vasculares) constituye un importante predictor de muerte metastásica, incluso más significativo que el tamaño del tumor, el tipo celular y la localización del tumor (Rummelt et al., 1995; Folberg et al., 1993). Se han descrito nueve patrones vasculares: 1) "normal", 2) "silente" (ausente), 3) "recto" (con vasos distribuidos aleatoriamente), 4) "paralelo" (vasos rectos orientados paralelamente sin enlaces cruzados), 5) "paralelo con enlaces cruzados" (vasos orientados paralelamente y enlaces cruzados entre ellos), 6) "arcos" (fragmentos de vasos curvados o asas incompletamente cerradas), 7) "arcos con ramificaciones", 8) "asas" (un lóbulo o islote del tumor rodeado completamente por un asa vascular larga y cerrada) y 9) "redes" (compuestas por al menos tres asas interconectadas). Pues bien, la presencia de redes vasculares parece ser la variable más significativa asociada con mortalidad específica por el tumor (Folberg et al., 1993).

Infiltrado linfocitario

Alrededor del 5-10% de los melanomas uveales muestran cierto grado de infiltrado linfocitario (Duerin et al., 1990; de Waar-Siebinga et al., 1996). El aumento del número de linfocitos (p.e., por 20 CGA) se asociaba significativamente con el descenso de supervivencia, incluso cuando eran valorados otros factores (Durie et al., 1990; de Waard-Siebinga et al., 1996; de la Cruz et al., 1990).

Extensión extraescleral

La presencia de extensión extraescleral se observa en alrededor del 8% de los ojos enucleados por melanoma uveal (Anónimo, 1998). En tales casos la mortalidad a los 10 años estaba duplicada hasta alrededor del 75%, respecto a los casos en los que no existía extensión extraescleral (Seddon et al., 1983). Los tumores originados en el cuerpo ciliar suelen ser mayores y, por ello, es más probable que se asocien con extensión extraocular (Shammas et al., 1977).

5.3 Patobiológicos

Dentro de este apartado tiene mayor relevancia los aspectos concernientes a la proliferación celular, pero también deben contemplarse otras observaciones referidas a antígenos de histocompatibilidad, de citogenética y de genética molecular. (tabla 6)

Actividad celular proliferativa

Se han utilizado diferentes técnicas para valorar la actividad proliferativa en el melanoma uveal, tales como: visualización de las regiones organizadoras nucleolares mediante tinciones argénticas, determinación de aneuploidía tras cuantificación del ADN celular por citometría (de flujo y de imagen) y tinción inmunohistoquímica de algunos epitopos (Ki-67/MIB-1, PCNA...) (Singh et al., 2001; Naus et al., 2002)

Regiones organizadoras nucleolares

Las regiones organizadoras nucleolares (AgNORs) son condensaciones del ADN nucleolar, que se ven como manchas negras cuando son teñidos mediante tinciones de plata. La tinción argéntica de los AgNORs es un método objetivo para evaluar la malignidad de gran variedad de tumores. El conteo de AgNORs se correlaciona con el tamaño del tumor y con la actividad mitótica, de manera que puede tener valor pronóstico en el melanoma uveal (Marcus et al., 1990).

Expresión de inmunohistoquímica de marcadores de proliferación celular

Las células del melanoma uveal expresan una serie de antígenos asociados a melanomas, que pueden ser detectados con métodos inmunohistoquímicos, usando anticuerpos monoclonales (Mooy et al., 1995). Los dos antígenos más conocidos como marcadores específicos de proliferación celular son el Ki-67/MIB-1 y el PCNA, que se expresan cuando las células están en fase proliferativa. La actividad proliferativa del melanoma uveal se reduce tras irradiación tal y como ha sido demostrado al valorar la expresión del Ki-67/MIB-1 (Mooy et al., 1990) y del PCNA (Pre'er et al., 1994). Por otro lado, con en estas mismas técnicas, se ha observado en un estudio sobre la supervivencia a 10 años que la positividad es baja en el 84% de los casos y que en el 40% de los pacientes los tumores mostraban alta positividad; los pacientes con tumores altamente positivos tenían un mayor riesgo de 5'8 veces de morir de enfermedad metastasica (Seregard et al 1996). Un valor pronóstico similar al de la expresión antigénica de Ki-67 se ha realizado con la medición de MIB-1 en cortes histológicos de tejido incluido en parafina (Mooy et al., 1995; Chowers et al., 2001; Chowers et al., 2002).

Aneuploidía

El contenido de los ácidos nucleicos de las células puede ser valorado mediante citometría analítica, de flujo o de imagen (Meecham y Char, 1986); las células normales muestran un patrón diploide con un solo pico; la aneuploidía significa un contenido normal de ADN con múltiples picos representando tanto patrones hiperdiploides como hipodiploides; el grado de anormalidad de ADN se expresa como índice de ADN. En un estudio de 79 pacientes con melanoma uveal, la evolución clínica se correlacionaba con el contenido de ADN (ploidía). La aneuploidía en el

melanoma uveal se ha comparado con la presencia de células epitelioides (Mooy et al., 1995). Las anomalías en la ploidía probablemente refleja una población celular genéticamente inestable (que tiene una mayor habilidad para metastatizar), por lo que pueden ser mejores indicadores de pronósticos que los parámetros histopatológicos convencionales (Meecham et al., 1986; Mooy et al., 1995).

Antígenos de histocompatibilidad

Usando métodos inmunohistoquímicos puede valorarse la expresión de los antígenos de leucocitos humanos (HLA) (Jager et al., 1986). Un estudio sugiere que la micrometástasis de células de melanoma uveal cuando existe una baja expresión de antígenos HLA en la circulación sistémica facilita su aniquilamiento por las células “natural killer” y previene el desarrollo de metástasis. (de Waard-Siebinga et al., 1996).

Citogenética y genética molecular

Las investigaciones citogenéticas en el melanoma de coroides y de cuerpo ciliar han demostrado anomalías clonales afectando a los cromosomas 3, 6 y 8 (Singh et al 1994; White et al., 1998; Anastassiou et al., 2002). Las anomalías en los cromosomas 3 y 8 generalmente coexisten y están preferentemente presentes en los tumores del cuerpo ciliar. Por el contrario, las alteraciones del cromosoma 6 están más frecuentemente asociadas con tumores coroideos (Horsman et al., 1993). En un estudio de 54 pacientes con melanoma uveal que fueron tratados con enucleación, los hallazgos de monosomía 3 y la duplicación de 8q se asociaban con un índice de supervivencia del 40% a los 3 años, comparado con el 95% de supervivencia en ausencia de estos cambios citogenéticos (White et al., 1998). Además, se ha observado que el cuerpo ciliar y el melanoma son citogenéticamente distintos, mostrando el melanoma del cuerpo ciliar preferentemente monosomía del cromosoma 3 (Prescher et al., 1996). En un estudio citogenético detallado sobre el melanoma uveal en 54 pacientes, 30 melanomas mostraron monosomía. En 17 de estos pacientes (57%) se desarrolló enfermedad metastásica dentro de los 3 años siguientes. Por el contrario, de los 24 pacientes cuyo melanoma tenía un cromosoma 3 normal ninguno desarrolló enfermedad metastásica (Prescher et al., 1996). El mal pronóstico del melanoma de

cuerpo ciliar puede ser explicado parcialmente basándose en las anomalías citogenéticas distintivas (White et al., 1998; Prescher et al., 1996; Sisley et al., 1997).

En cuanto a lo relacionado con genética molecular, es preciso señalar que la expresión del *c-myc* (un oncogén involucrado en la proliferación celular) ha sido estudiada detalladamente mapeando la región cromosómica 8q, que frecuentemente está alterada citogenéticamente en el melanoma uveal.

En un estudio inmunohistoquímico del 24 melanomas uveales, la expresión del *c-myc* –tanto nuclear como citoplásmica- se observó hasta en el 85% del melanoma uveal y se correlacionaba con el índice proliferativo, pero no con el tipo celular (Royds et al., 1992). En otro estudio de 51 pacientes con melanoma uveal, el análisis estadístico multivariante mostró un significado pronóstico de las células *c-myc* positivas (Mooy et al., 1995). Parece existir una correlación inversa entre la expresión *c-myc* y los antígenos HLA, sugiriendo que el *c-myc* regula la expresión HLA, y de ahí la influencia de la respuesta inmune en el melanoma uveal (Blom et al., 1997).

Tabla 6 . Factores pronósticos citológicos y genéticos en el melanoma uveal

<i>Categoría</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Autor</i>	<i>Año</i>
<i>Proliferación celular</i>			
<i>AgNORs</i>	Elevado nº de AgNOR	Marcus	1990
<i>Aneuploidía (CF)</i>	Índice de ADN alto	Meecham	1986
<i>Expresión de Ki-67/MIB-1</i>	Expresión elevada	Mooy	1995
<i>Expresión de PCNA</i>	Expresión elevada	Seregard	1996
<i>Antígenos de histocompatibilidad</i>	Elevada expresión de HLA-A	Jager	1986
<i>Citogenética</i>	Monosomía 3	White	1998
	Duplicación 8q	White	1998
<i>Genética molecular</i>	Expresión de <i>c-myc</i>	Mooy	1995

Conclusiones

Varios factores pronósticos clínicos, cito-histopatológicos, genéticos y moleculares han sido identificados, aunque con diferente significado, en el melanoma uveal. Estos factores pronósticos en el melanoma uveal están prácticamente relacionados todos ellos con las características del tumor y no con aspectos referidos al huésped o al ambiente (incluyendo las modalidades terapéuticas). Podrían establecerse tres categorías de factores pronósticos en el melanoma uveal (Singh et al., 2001)

1ª) Esenciales: localización y tamaño del tumor.

2ª) Adicionales: configuración del tumor, tipo (morfología) de las células neoplásicas, arquitectura de la microcirculación (patrones vasculares), infiltrado lifocitario asociado y extensión extraescleral.

3ª) Nuevos y prometedores: proliferación celular (con marcadores IHQ del Ki-67/MIB-1), factores citogenéticos y expresión del c-myc.

En definitiva, de lo que se trata estudiando los factores pronósticos es poder detectar los casos con mayor riesgo de metástasis y, por consiguiente, de muerte por melanoma. Estos pacientes pueden ser candidatos a una terapia adyuvante sistémica (inmuno- o quimioterapia); sin embargo, en el momento actual el papel de estos métodos terapéuticos no se ha establecido de manera convincente (Shields et al., 1993; McLean, 1990).

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

El melanoma uveal constituye un tumor relativamente infrecuente, cuya histopatología y clínica son bien conocidos. No obstante, existe gran controversia en cuanto a las opciones terapéuticas, su comportamiento biológico resulta ciertamente enigmático quizás por el desconocimiento de aspectos básicos referidos a la iniciación, transformación y progresión neoplásica en estas lesiones melanocíticas del globo ocular.

Clásicamente se ha establecido una relación entre el pronóstico de los melanomas uveales (del iris, del cuerpo ciliar y, sobre todo, de coroides) con sus aspectos clínicos (localización, tamaño y configuración del tumor, método de tratamiento) e histopatológicos (patrón crecimiento, tipo celular, actividad mitótica,...). En la actualidad, la posibilidad de aplicar técnicas biomoleculares a los cortes histológicos facilita una mejor comprensión de la biología de los tumores y permite reevaluar los criterios y características microscópicas.

En este sentido, aunque la inmunohistoquímica constituye actualmente una herramienta útil para el conocimiento patobiológico esencial, diagnóstico y pronóstico de numerosos tumores (al contribuir a determinar el fenotipo y heterogeneidad de la proliferación celular, la actividad proliferativa y su control, etc.), apenas se ha aplicado al estudio del melanoma uveal. Probablemente, el cambio de actitud terapéutica en los últimos años (con incremento de las opciones conservadoras respecto a la enucleación) explica que el material tisular disponible para el estudio anatomopatológico sea muy ocasional y en consecuencia, no haya habido prácticamente aportaciones relevantes en este campo de la oncopatología.

Por todo ello, en este trabajo -realizado en una amplia serie de melanomas uveales primitivos (diagnosticados y tratados, mediante enucleación, en diferentes centros)-se pretende:

- a) Comprobar si el inmunofenotipo del melanoma uveal es semejante al del melanoma en otras localizaciones.
- b) Conocer la interrelación entre los diferentes aspectos cito-histopatológicos del tumor y diferentes parámetros patobiológicos, tales como el perfil inmunohistoquímico de proliferación (Ki-67), de expresión de oncogenes (Bcl-2, c-erb-B2) y genes supresores (p53).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se han estudiado 56 melanomas primitivos uveales, diagnosticados histológicamente, entre los años 1975 y 2003, en los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales: Clínico Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga, U. Regional “Carlos Haya” de Málaga, Universitario “Virgen Macarena” de Sevilla y General “Torrecárdenas” de Almería.

Fueron excluidos todos aquellos casos de metástasis en el globo ocular (tumores secundarios) y los melanomas primitivos de otras estructuras oculares o anejos (conjuntiva, párpados...).

1. DATOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS

Edad y sexo

De cada paciente se recogió la edad (en años) en el momento del diagnóstico y el sexo (hombres/mujeres). Para el tratamiento estadístico se hicieron los siguientes grupos etáreos: pacientes menores de 40 años, de 40 a 60 y mayores de 60 años.

Localización del tumor

Los melanomas fueron clasificados según la localización inicial dentro del tracto uveal: iris, cuerpo ciliar y coroides.

Tamaño del tumor

El tamaño del tumor considerado correspondía al del diámetro mayor, post-fijación, en centímetros.

2. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO CONVENCIONAL (Figs. 18-34)

Para el estudio histopatológico, se utilizaron las muestras fijadas en formol tamponado al 10%, incluidas de forma rutinaria en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina. De cada caso, se revisaron entre 1 y 9 preparaciones, eligiéndose la muestra más representativa para el estudio de las características tumorales.

Las *características evaluadas* fueron:

Patrón-histológico y tipos celulares: Se estudió si el crecimiento neoplásico era:

1) Fusocelular (Figs.18-28):

- A) Células cohesionadas, con bordes definidos, núcleos con repliegues/hendiduras nucleares a lo largo del eje axial.
- B) Células con núcleos mayores y redondeados ("rechonchos"), con nucleolos ligeramente prominentes. Además, se valoró si las células estaban cohesionadas y los bordes mal definidos.

2) Epiteliode (Figs. 29,30): Células mayores no cohesionadas, con bordes más definidos (delimitados), gran núcleo ovoide, con nucleolo prominente.

3) Mixto (Fig. 31)

Presencia de necrosis (Figs. 32-33). Identificada por citoplasmas densamente eosinófilos con núcleos en cariorrexis o sin ellos, acompañada de infiltrado inflamatorio agudo. Se valoró la ausencia de necrosis, si existían sólo áreas de necrosis o si la necrosis era masiva.

Pigmentación melánica. Se valoró:

- 1) La ausencia o escasa cantidad de melanina (<20% de la masa tumoral valorable) (Figs. 26,28).
- 2) Abundante /moderada ($\geq 20\%$ -<75% de la masa tumoral) (Fig. 34).
- 3) Muy abundante/intensa (>75% de la masa tumoral) (Fig. 35)

Pleomorfismo celular/nuclear

- 1) Escaso (Fig. 19,26).
- 2) Moderado (Figs. 22,28).
- 3) Intenso (Figs. 29,30).

Prominencia nucleolar

- 1) Ausencia de nucleolo relevante (Figs. 20,27).
- 2) Ligera prominencia nucleolar (Fig. 22, 23).
- 3) Nucleolo muy prominente, con halo claro perinucleolar (Figs. 29,30)

Presencia de hendiduras nucleares longitudinales (Figs. 20,27)

- 1) No
- 2) Si

Mitosis (Fig. 21,30)

- 1) No identificables
- 2) Escasas
- 3) Frecuentes

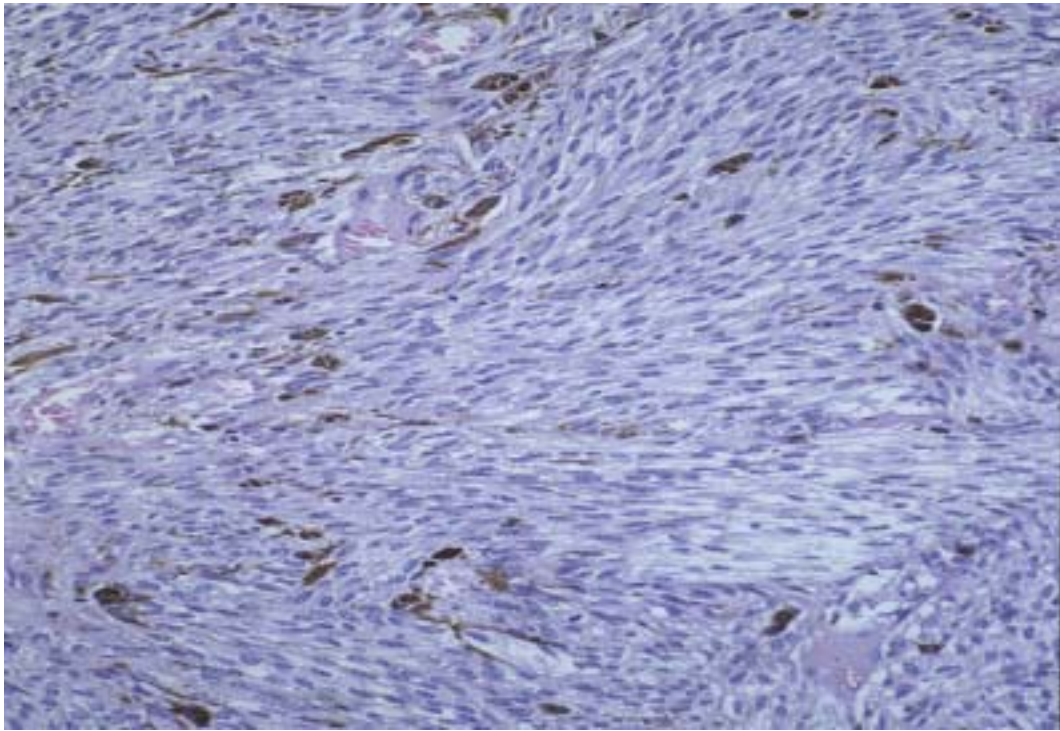


Fig. 18.- Melanoma de coroides: patrón fusocelular.

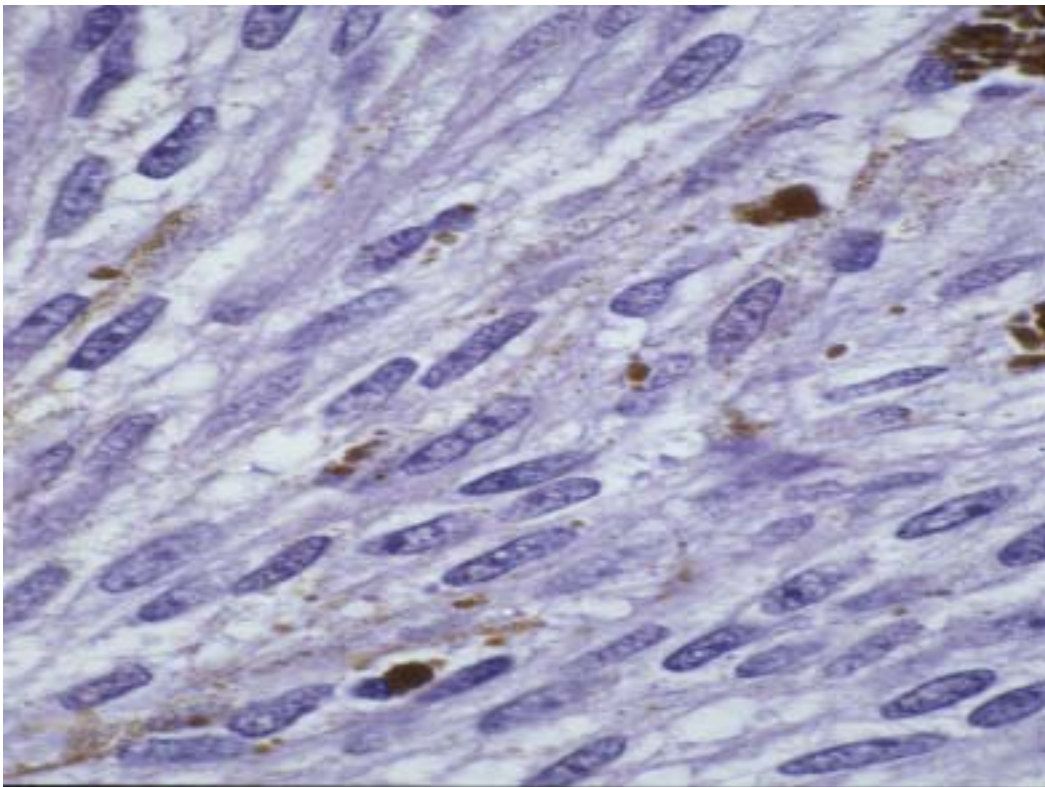


Fig. 19.- Melanoma de coroides: patrón fusocelular.

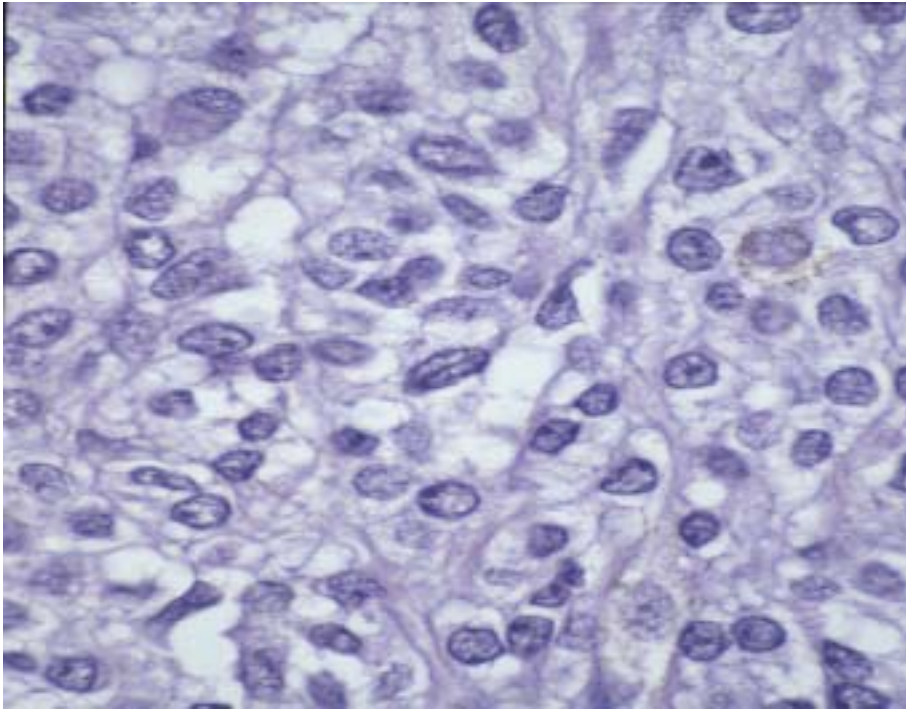


Fig. 20.- Melanoma de coroides: células fusiformes, en diferentes orientaciones; en el centro, véase una imagen de hendidura nuclear longitudinal.

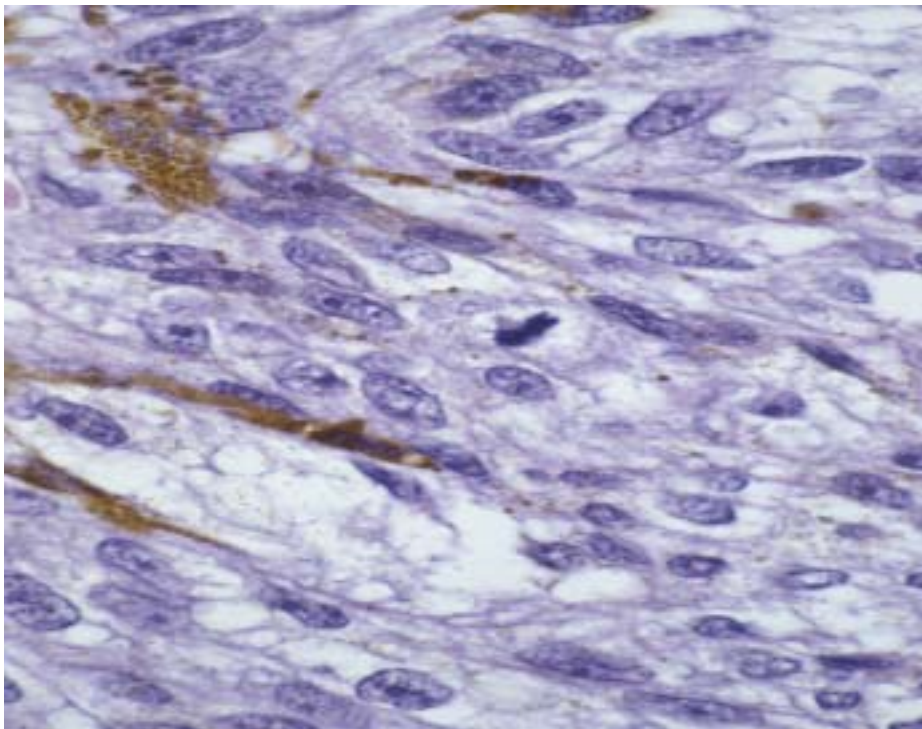


Fig. 21.- Melanoma de coroides: células fusiformes; en el centro, véase una célula en mitosis.

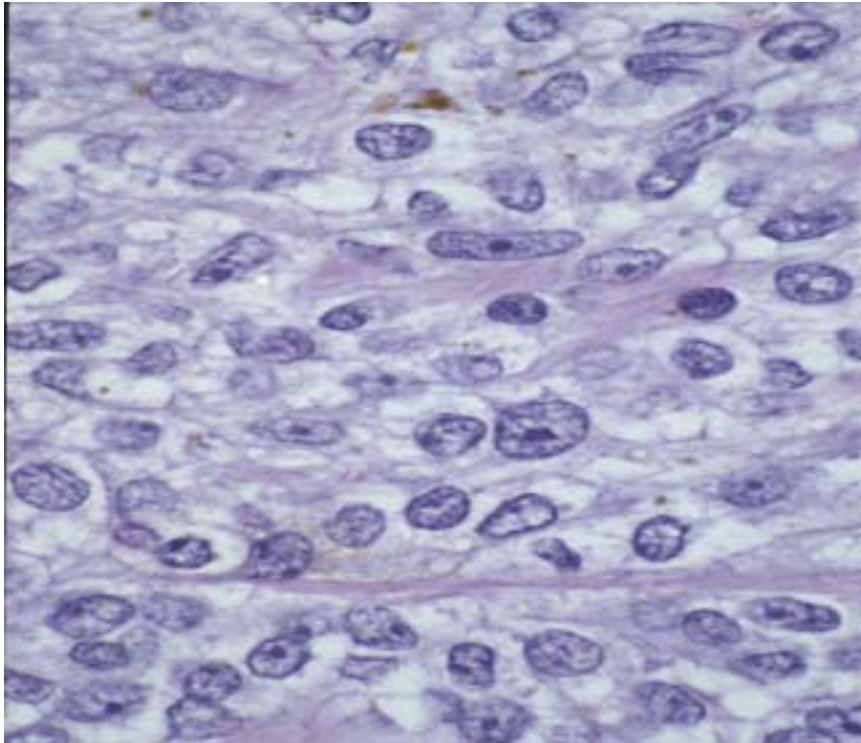


Fig. 22.- Melanoma de coroides: células fusiformes, con discreto pleomorfismo celular/nuclear y ocasional prominencia nucleolar

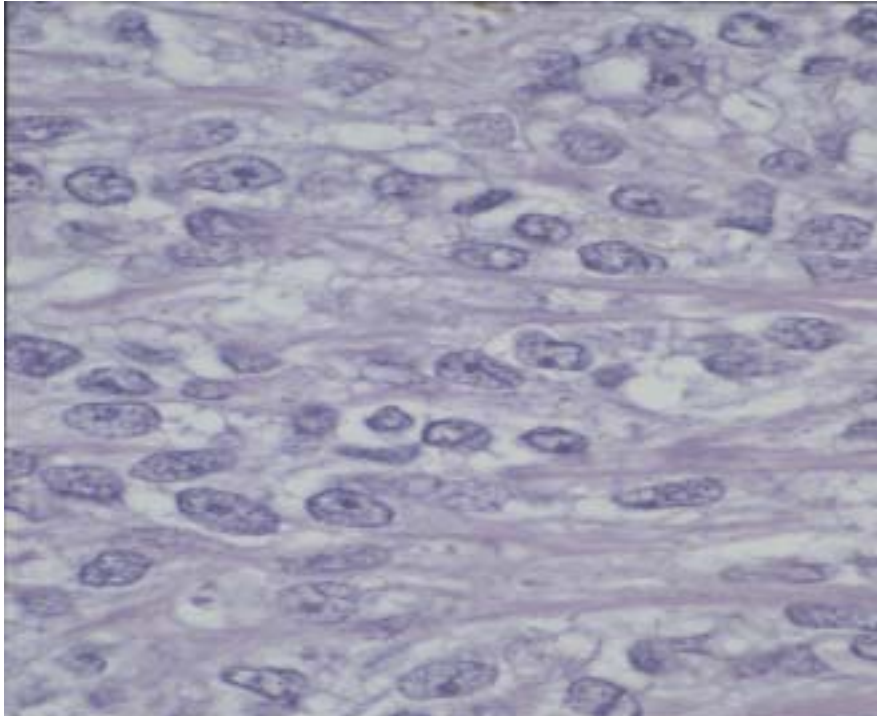


Fig. 23.- Melanoma de coroides: células fusiformes, con ligero pleomorfismo celular y algunas hendiduras nucleares longitudinales

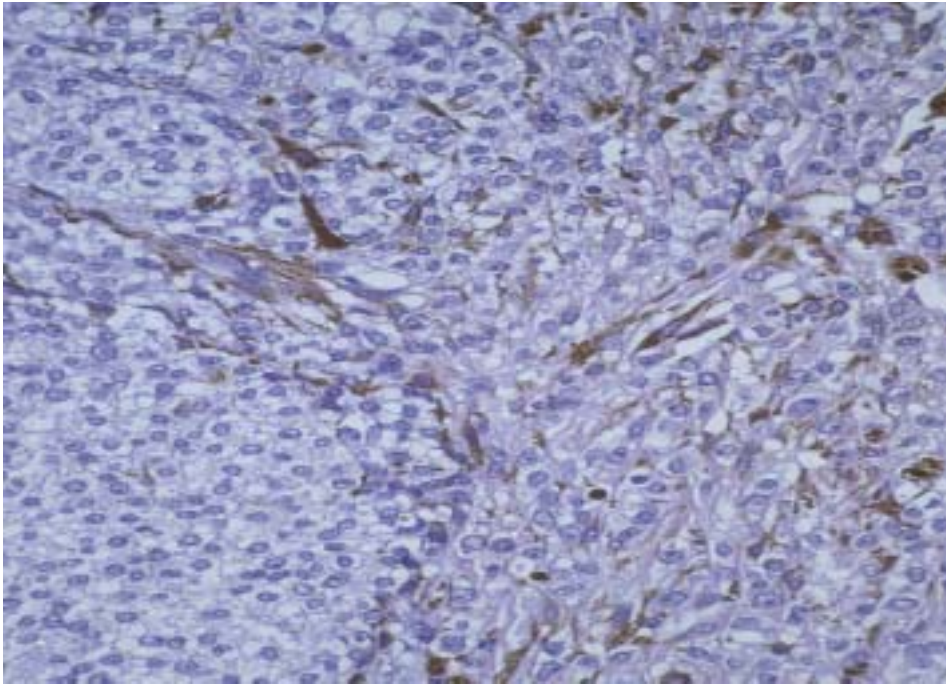


Fig. 24.- Melanoma del cuerpo ciliar: células fusiformes, con moderado grado de pigmentación melánica.

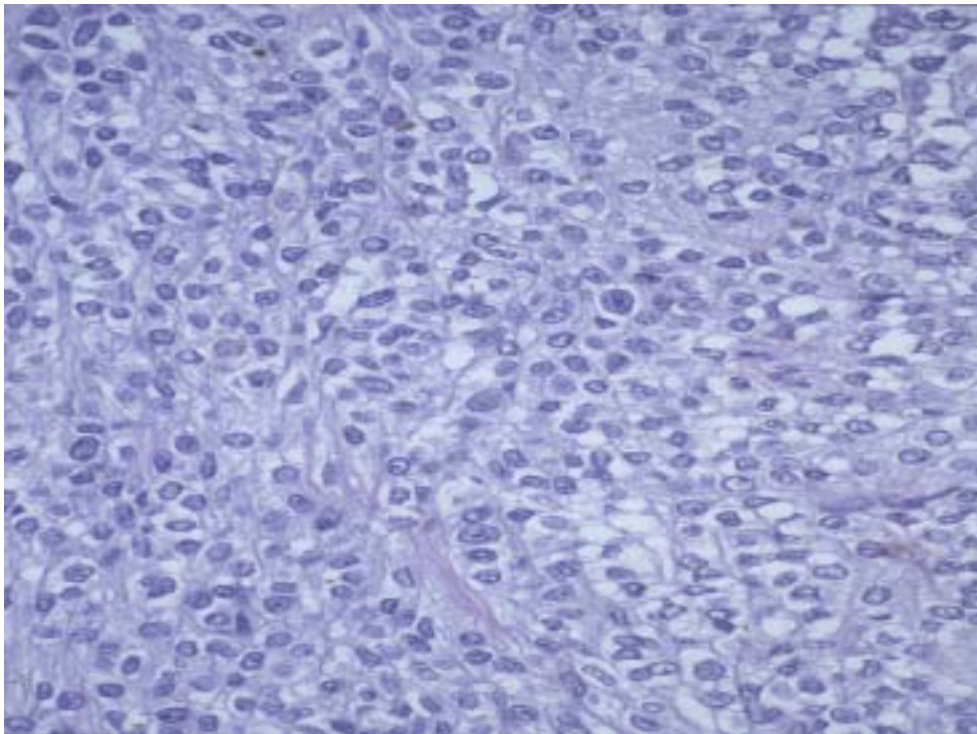


Fig. 25.- Melanoma del cuerpo ciliar: células fusiformes, la mayoría de ellas seccionadas en sentido transversal.

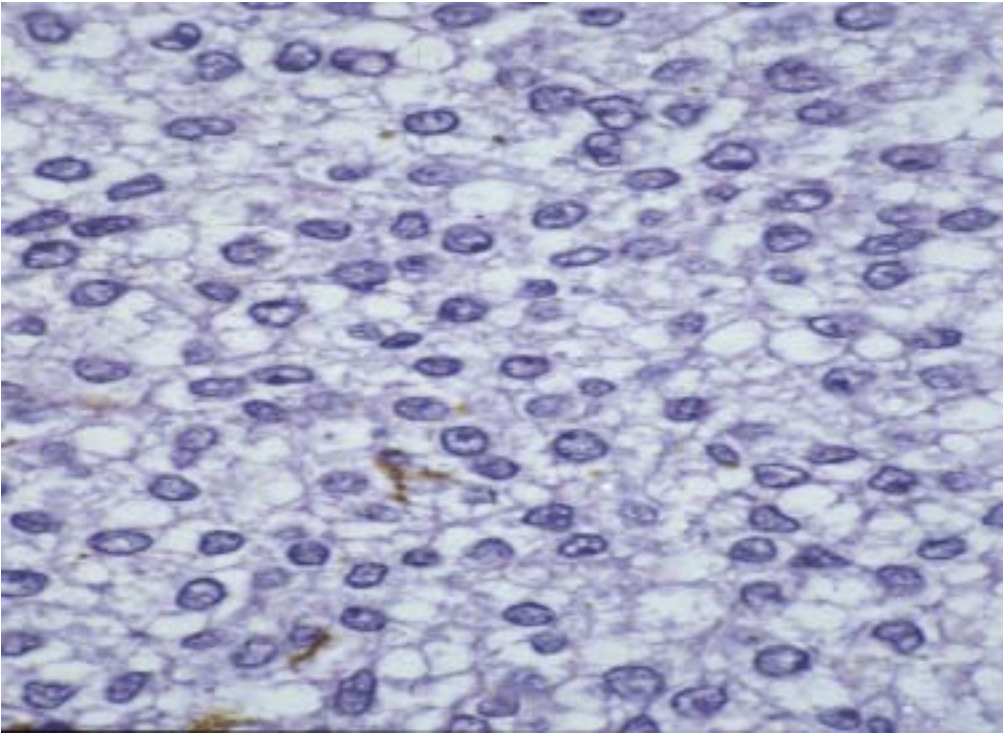


Fig. 26.- Melanoma del iris: células fusiformes, con escaso grado de pigmentación melánica.

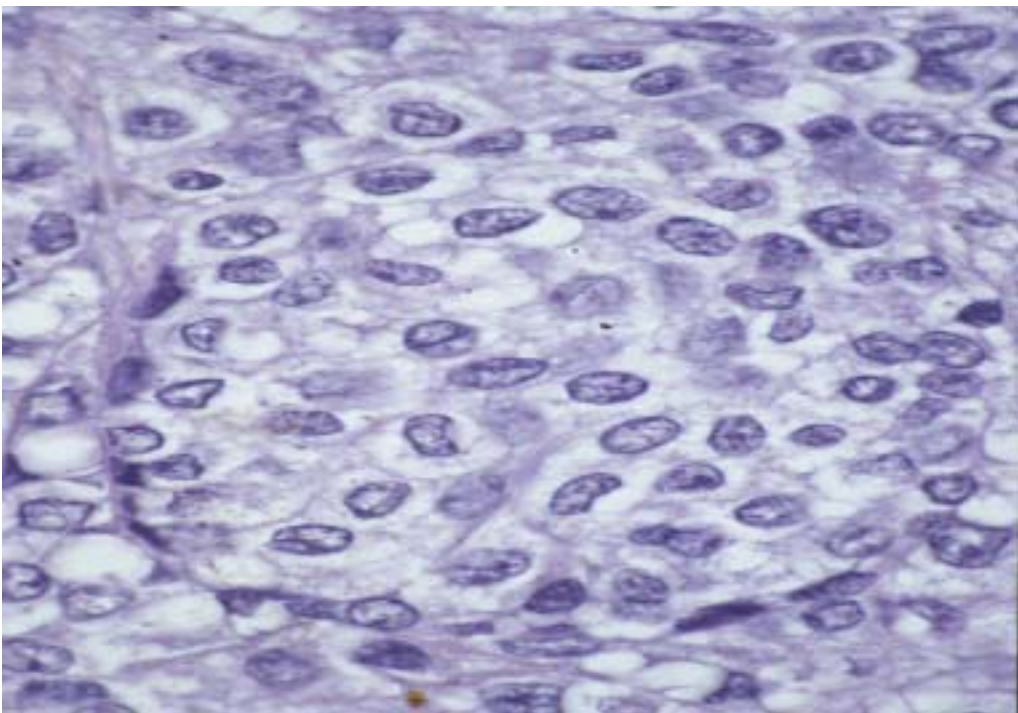


Fig. 27.- Melanoma del iris: células fusiformes, con escasa prominencia nuclear o pleomorfismo y presencia de algunas hendiduras nucleares longitudinales.

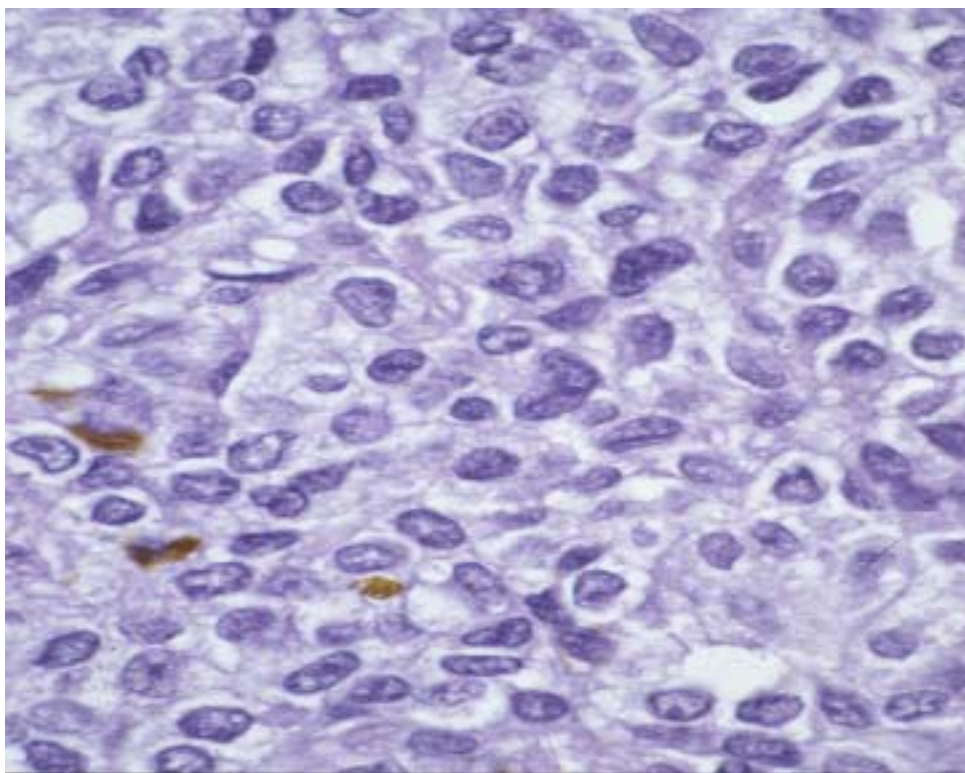


Fig. 28.- Melanoma de coroides: células fusiformes, con escasa pigmentación melánica y moderado pleomorfismo celular/nuclear.

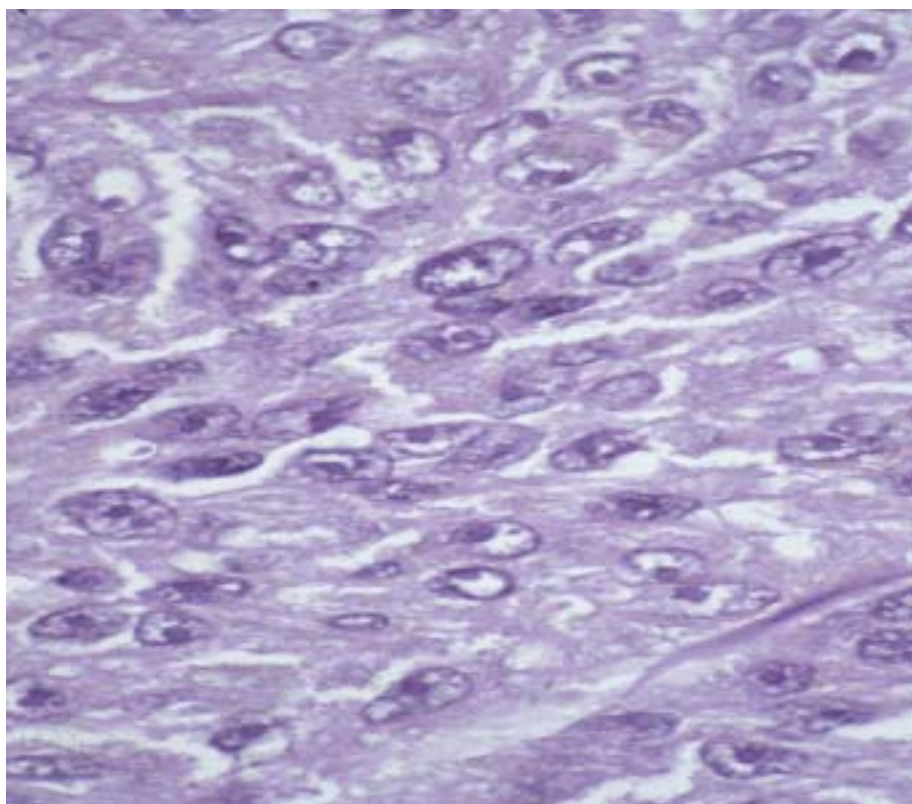


Fig. 29.- Melanoma de coroides: células epitelioides predominantes, con frecuente prominencia nucleolar.

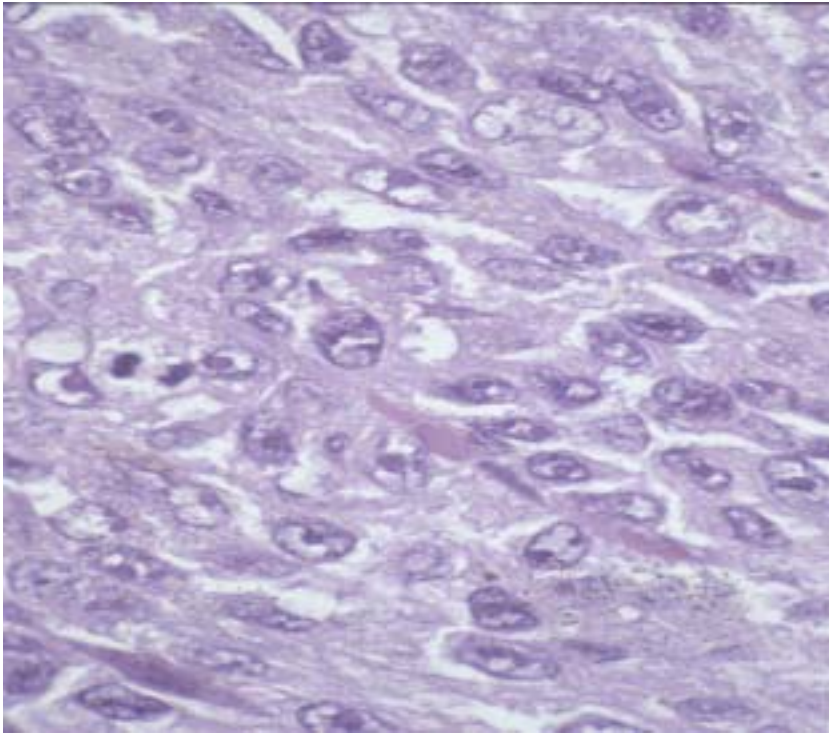


Fig. 30.- Melanoma de coroides: células epitelioides predominantes, con algunas figura de mitosis (en centro-izquierda).

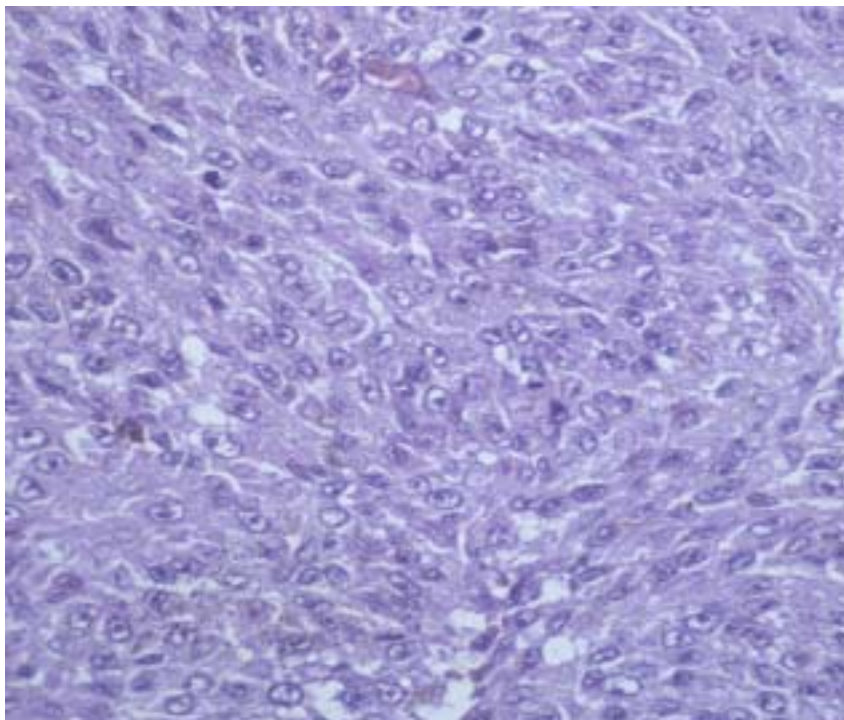


Fig. 31.- Melanoma de coroides: celularidad mixta, con zonas de predominio de células epitelioides (arriba-izquierda) y fusocelulares (abajo-derecha).

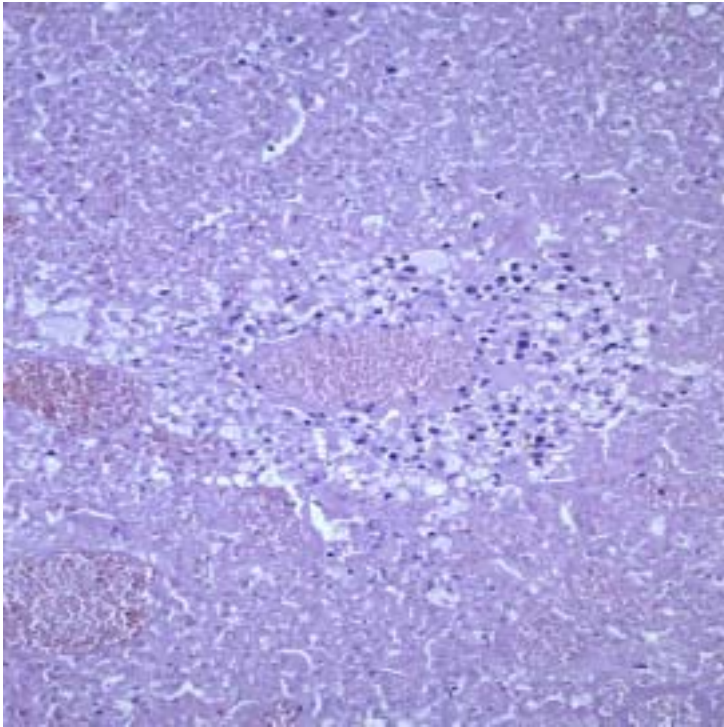


Fig. 32.- Melanoma de coroides: necrosis (véase que solamente queda preservada una franja celular en torno a un vaso).

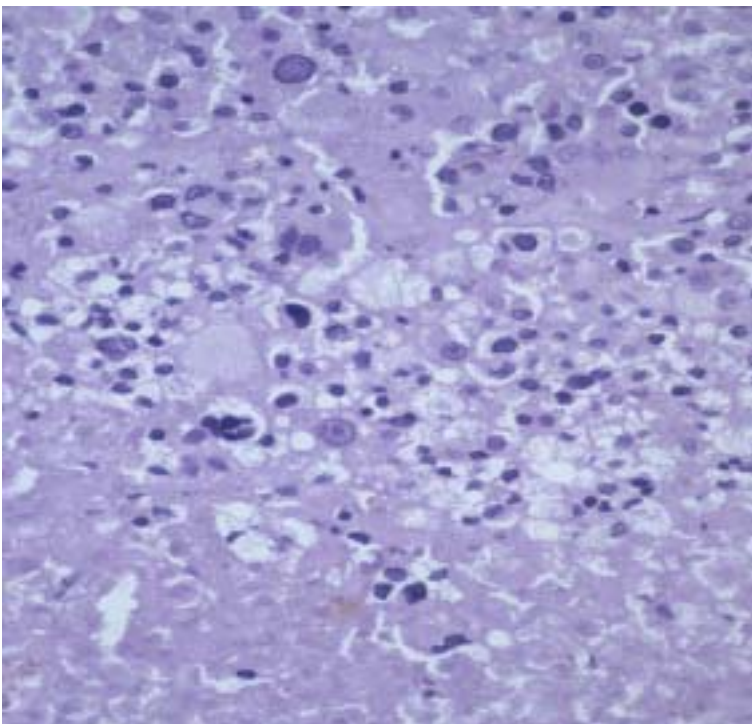


Fig. 33.- Melanoma de coroides: zona de necrosis, con algunas células neoplásicas preservadas.

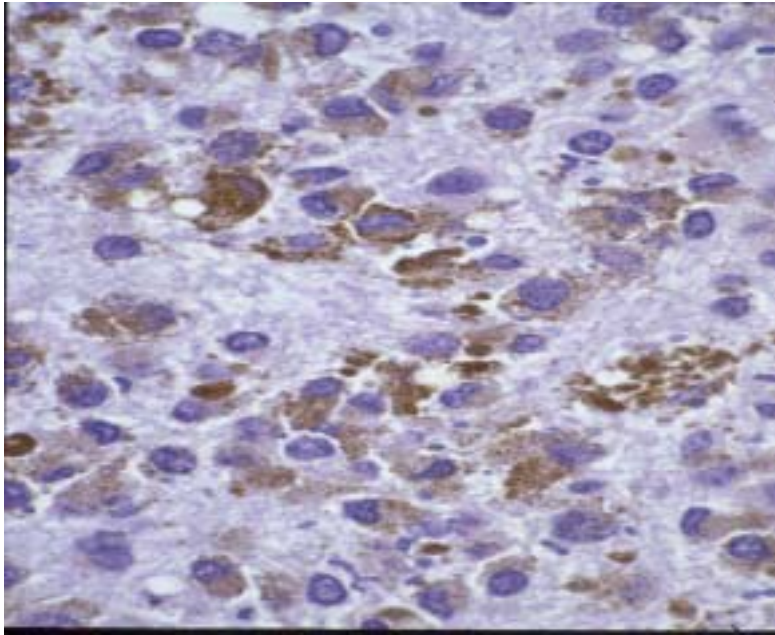


Fig. 34.- Melanoma de coroides, con abundante pigmentación melánica.

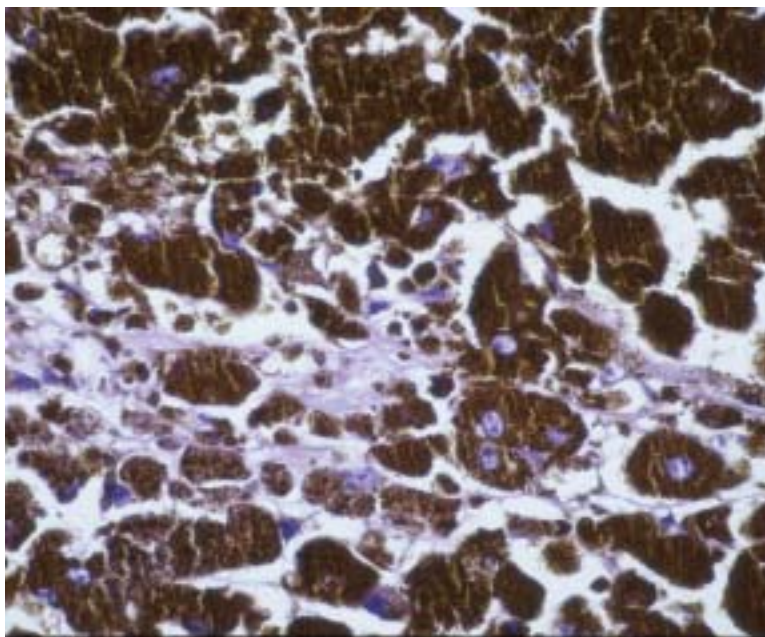


Fig. 35.- Melanoma de coroides, con pigmentación melánica masiva.

3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Los melanomas uveales fueron estudiados mediante inmunohistoquímica, empleando los siguientes anticuerpos primarios:

- a) *Vimentina*, anticuerpo monoclonal (clona V9, isotipo IgG1, kappa; Dako), que reacciona con numerosas células de origen mesenquimal.
- b) *Proteína S-100* (Fig. 36), anticuerpo policlonal (Z0311; Dako) que reacciona con la proteína humana S-100 A y B humanas, que se expresa en el citoplasma de células gliales y ependimales. La proteína S-100 está presente en la mayoría de los tumores melanocíticos cutáneos (benignos y malignos) y en las metástasis de los melanomas malignos.
- c) El anticuerpo monoclonal *HMB-45* (Dako) (Fig. 37), antimelanosomas, se expresa en la mayoría de los melanomas (y, raramente, en otros tumores), permitiendo la diferenciación melanocítica versus melanomas.
- d) *Melan A*, el antígeno melan-A/MART1 (Dako), es una proteína transmembrana compuesta por 118 aminoácidos. La función de esta proteína permanece aún desconocida. Se expresa en el 90% de los melanomas, así como en los melanocitos.
- e) Antisuero contra el antígeno *Ki-67* (MIB-1, Dako), que reconoce epítomos de proteínas entre 345 y 395 Kda, que se expresan en el núcleo de las células en proliferación. Se cuantificó la expresión de Ki-67/MIB-1 valorando si la proliferación:
 - era inferior al 5% (Fig. 38).
 - del 5 al 20% (Fig. 39).
 - superior 20% (Fig. 40).
- f) El anticuerpo *p53*, clona DO7, (Dako) que reconoce un epítomo -resistente a la fijación- de la porción aminoterminal, situado entre los aminoácidos 35 y 45, presente tanto en la proteína salvaje como en la mutada. Se valoró la positividad o negatividad de la reacción.
- g) La *oncoproteína Bcl-2* (Dako) codifica un gen relacionado con la traslocación cromosómica (14;18). La oncoproteína Bcl-2 desempeña un papel importante central en la apoptosis, actuando como inhibidor del proceso apoptótico.

- h) Para la detección de la sobreexpresión de la *oncoproteína c-erb-B2* se utiliza un anticuerpo policlonal (Dako), que reconoce un epítipo de la porción intracitoplasmática de la membrana celular de la proteína. La sobreexpresión de c-erb-B2 se ha asociado con mal pronóstico en tumores de mama así como otros tipo de cánceres.

Para ello, se realizaron cortes consecutivos, de 4-5 micras, en portas silanizados capilares, con 75 micras de espacio (Dako ChemMate), especiales para su uso en el equipo de inmunotinción automatizada Dako TechMate Horizon. Cada una de las preparaciones fue sometida al protocolo de tinción inmunohistoquímica que se describe a continuación, empleando, para visualización de la reacción antígeno-anticuerpo, el sistema biotina-estreptavidina–peroxidasa de Dako.

Tinción inmunohistoquímica

- 1) Desparafinar con xilol e hidratación en alcoholes decrecientes hasta agua destilada.
- 2) Recuperación antigénica en olla a presión ultrarápida, utilizando como solución recuperadora de antígenos tampón citrato a pH=6.
- 3) Aclarar las preparaciones con agua destilada.
- 4) Lavar con PBS.
- 5) Colocar los portas, con sus controles correspondientes, en el equipo Dako TechMate Horizon, donde se llevará a cabo de manera programada el proceso de tinción inmunohistoquímica.
- 6) Lavar con agua destilada.
- 7) Deshidratación en alcoholes crecientes, xilol y montaje (DPX).

Protocolo de inmunotinción (TechMate Dako)

<i>Paso programado</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>
Lavado buffer (PBS)	3.00
Anticuerpo primario	25.00
PBS	4.00
Anticuerpo secundario	25.00
PBS	2.00
Solución peroxidasa bloqueante	7.00
PBS	2.45
Estreptavidina-peroxidasa	25.00
PBS	4.00
Cromógeno (DAB)	5.00
PBS	2.15
Cromógeno (DAB)	5.00
PBS	2.15
Cromógeno (DAB)	5.00
PBS	1.50
Hematoxilina	1.00
PBS	4.50
Lavado (H2O)	1.30

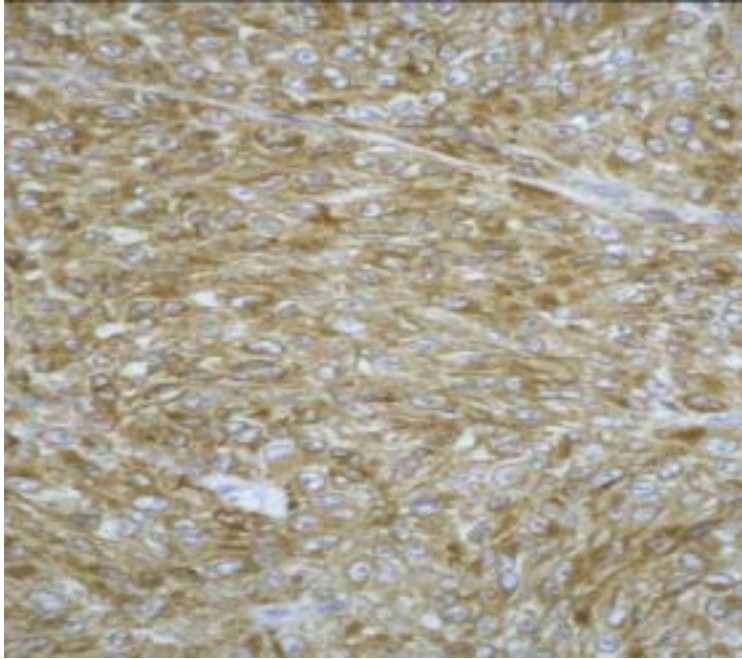


Fig. 36.- Melanoma de coroides: expresión IHQ de S-100.

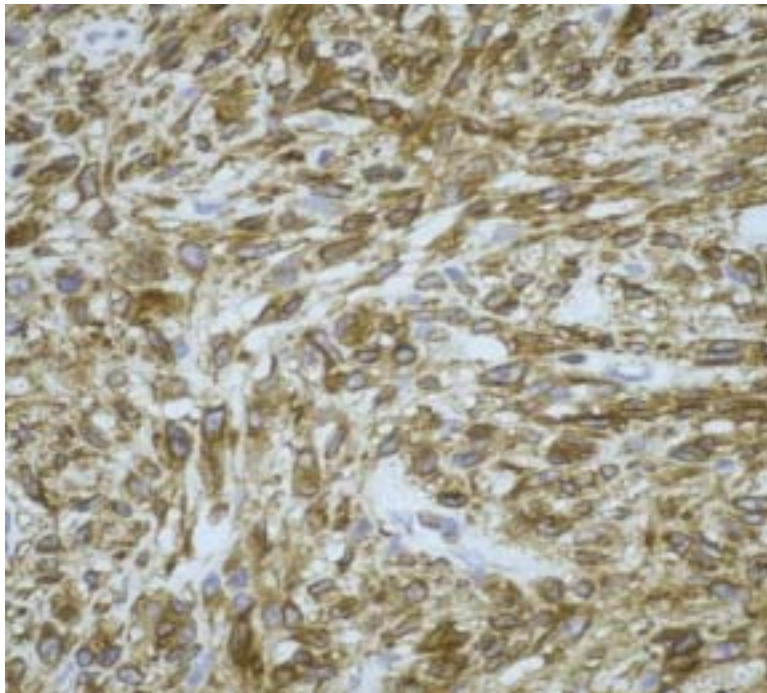


Fig. 37.- Melanoma de coroides: expresión IHQ de HMB-45.

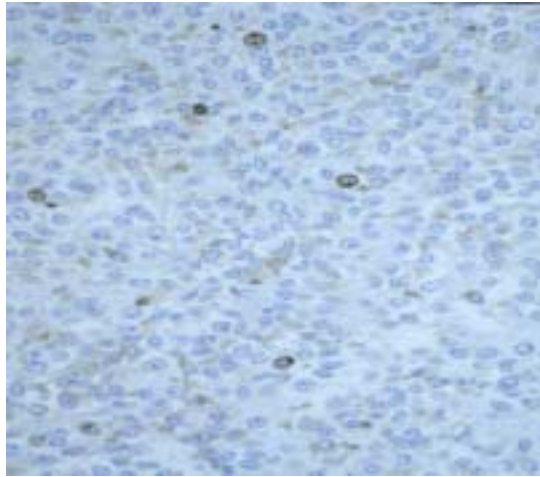


Fig. 38.- Melanoma de coroides: expresión IHQ de Ki-67/MIB-1 en baja proporción.

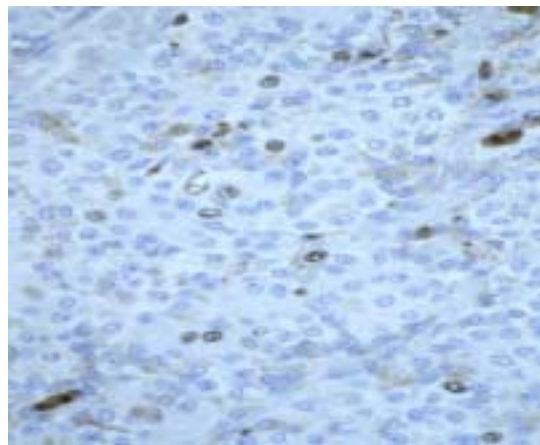


Fig. 39.- Melanoma de coroides: expresión IHQ de Ki-67/MIB-1 en proporción intermedia.

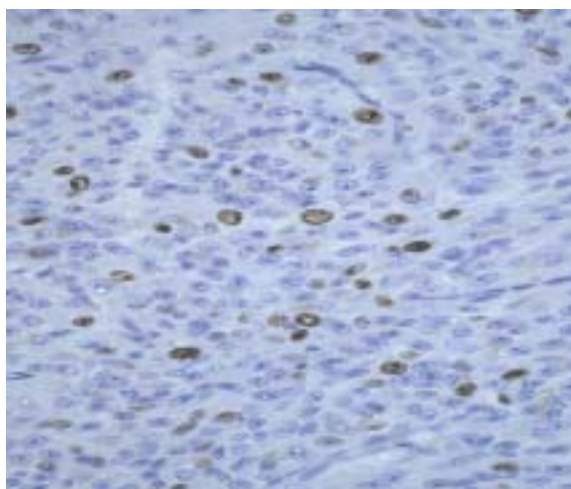


Fig. 40.- Melanoma de coroides: expresión IHQ de Ki-67/MIB-1 en proporción alta.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recogidos se procesaron mediante el programa estadístico SPSS 11.5. Todas las variables consideradas fueron sometidas previamente a un estudio estadístico descriptivo básico. Las variables cuantitativas fueron evaluadas por su valor numérico real, tomando como valores representativos la media aritmética (M) y la desviación típica (DT), como parámetros de centralización y dispersión, respectivamente. Las variables cualitativas se distribuyeron en 2 a 5 categorías calculando las frecuencias absolutas y relativas.

Mediante la aplicación de métodos estadísticos univariantes se ha establecido:

- a) Correlación de las variables clínicas con variables anatomopatológicas convencionales.
- b) Correlación de las variables variables anatomopatológicas más relevantes con los marcadores biomoleculares estudiados.

En todos los casos las variables cualitativas se evaluaron por medio de tablas de contingencia, aplicando el test de la Chi-cuadrado o mediante la “prueba del estadístico exacto de Fisher”, considerando siempre que las celdas tuviesen una frecuencia esperada mayor de 5 (porcentaje inferior al 30%). Con las variables cuantitativas, para comprobar la igualdad o no de los valores en los grupos analizados, se realizó un análisis de la varianza, comprobándose previamente la normalidad e igualdad de la varianza. Si se aceptaba la hipótesis nula (de igualdad de estadísticos) se aplicó el test de la "t de Student" (en caso de que la variable categórica tuviese dos grupos) o un ANOVA (si tenía más de dos grupos). Del mismo modo, para establecer la correlación entre variables continuas se empleó el coeficiente de Pearson. Se tomó como valor estadísticamente significativo $p < 0.05$ o nivel de confianza del 95%.

IV. RESULTADOS

A. ESTUDIO DESCRIPTIVO GENERAL

1. CASOS

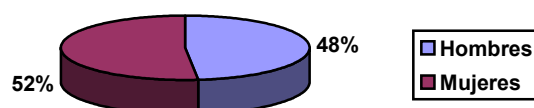
Presentamos los resultados de 56 casos de melanoma primario uveal (iris, cuerpo ciliar y coroides).

2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MACROSCÓPICAS

a) Sexo

Del total de casos estudiados, 29 casos (51.8%) correspondieron a mujeres y 27 (48.2%) a hombres (Figura 41).

Figura 41. Melanoma uveal: Distribución de los casos según el sexo



b) Edad

La media de edad de los pacientes de la serie de melanomas uveales fue de 64.15 años, observándose una mayor frecuencia de aparición de este tumor en personas de menos de 60 años. (Tabla 7).

Tabla 7. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la edad

Grupos etáreos	Nº de casos	Porcentaje (%)
<40 años	11	19,6
40 a 60 años	24	42,9
>60 años	21	37,5
Total	56	100,0

c) Distribución de los casos por grupos de edad y sexo

En los hombres el grupo de edad más frecuente fue el comprendido entre 40 y 60 años, mientras en las mujeres fue el de más de 60 años (Tabla 8).

Tabla 8. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la edad y sexo.

		SEXO		Total
		Hombres	Mujeres	
Edad (años)	<40	4	7	11
	40 a 60	14	10	24
	>60	9	12	21
Total		27	29	56

d) Localización del tumor

Los melanomas coroideos (80%) predominaron sobre aquellos localizados en el cuerpo ciliar(10%) y en el iris (el 7%) (Tabla 9).

Tabla 9. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la localización

Localización	Nº de casos	Porcentaje (%)
Iris	4	7,1
Coroides	46	82,1
Cuerpo ciliar	6	10,7
Total	56	100,0

e) Tamaño del tumor

El tamaño registrado (diámetro mayor, postfijación, en centímetros) en 53 casos de los melanomas uveales estudiados son los siguientes: media de 2,21 cm, desviación típica de 1,98, siendo el tamaño mínimo de 1 cm y el máximo de 9 cm.

f) Distribución de los casos por localización y tamaño

Los melanomas uveales ubicados en iris y cuerpo ciliar fueron más grandes (3,83 y 3,18 cm, respectivamente) que los de coroides (1,97 cm) (Tabla 10).

Tabla 10. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la localización y el tamaño del tumor

TAMAÑO					
	Nº de casos	Media	DT	Mínimo	Máximo
<i>Iris</i>	3	3,833	2,0207	1,5	5,0
<i>Coroides</i>	44	1,970	1,7727	1,0	9,0
<i>Cuerpo ciliar</i>	6	3,183	3,0301	1,1	9,0
Total	53	2,213	1,9871	1,0	9,0

Significación estadística. $p=0,130$

3. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

a) Patrón histológico

Veintinueve casos (51.8%) tenían patrón histológico de tipo fusiforme, 10 casos (17.9%) epitelioide y 16 (28.6%) de tipo mixto (Tabla 11).

Tabla 11. Melanoma uveal: Distribución de los casos según el patrón histológico

Patrón histológico	Nº de casos	Porcentaje (%)
Fusocelular	29	51,8
Epitelial	10	17,9
Mixto	16	28,6
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

b) Necrosis

Pudimos comprobar ausencia de necrosis tumoral en el 80.4% de los casos y presencia en el 17.9% (Tabla 12).

Tabla 12. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la presencia necrosis

Necrosis	Nº de casos	Porcentaje (%)
Ausencia	45	80,4
Areas de necrosis	7	12,5
Necrosis masiva	3	5,4
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

c) Pigmentación melánica

Se pudo observar melanina en todas las muestras valoradas, aunque se observaron algunas diferencias en presencia de este pigmento como queda de manifiesto en la siguiente tabla (Tabla 13):

Tabla 13. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la existencia de pigmentación melánica

Pigmentación melánica	Nº de casos	Porcentaje (%)
< 20%	22	39,3
20-75%	18	32,1
>75%	15	26,8
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

d) Pleomorfismo celular/nuclear

Se observó un moderado pleomorfismo celular/nuclear en un porcentaje elevado de casos (66.1%) (Tabla 14).

Tabla 14. Melanoma uveal: Distribución de los casos según el pleomorfismo celular/nuclear

Pleomorfismo nuclear/celular	Nº de casos	Porcentaje (%)
Escaso	11	19,6
Moderado	37	66,1
Intenso	7	12,5
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

e) Prominencia nucleolar

Se pudo observar prominencia nucleolar en el 75% de los casos estudiados (Tabla 15).

Tabla 15. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la prominencia nucleolar

Prominencia nucleolar	Nº casos	Porcentaje (%)
Ausencia	13	23,2
Ligera	37	66,1
Intensa	5	8,9
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

f) Hendiduras nucleares longitudinales

La presencia de hendiduras nucleares se observó en el 19.6% de los casos (Tabla 16).

Tabla 16. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la presencia de hendiduras nucleares longitudinales

Hendiduras nucleares longitudinales	Nº casos	Porcentaje
No	44	78,6
Si	11	19,6
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

g) Mitosis

La actividad mitótica fue valorada realizando un recuento del número de mitosis en toda la extensión de la muestra. De forma general no se detectó actividad mitótica en el 46,4% de los casos, actividad muy baja en el 46,6% de los casos y alta en el 3,6% (Tabla 17).

Tabla 17. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la presencia mitosis

Mitosis	Nº casos	Porcentaje
No identificables	26	46,4
Escasos	26	46,4
Frecuentes	2	3,6
Perdidos del sistema	2	3,6
Total	56	100,0

3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

a) Marcadores IHQ de melanoma

Las células neoplásicas de todos expresaron vimentina, proteína S-100, HMB-45 y melan-A (figs. 36 y 37), existiendo un fenómeno de difusión de la “positividad” a nivel de las áreas de necrosis.

b) Distribución de los casos según la expresión de Ki-67

La cuantificación de la inmunoreactividad frente al antígeno Ki-67 fue realizado tras el recuento de células tumorales con reacción positiva y específica en toda la muestra, y fue presentada en forma de porcentaje del total de células valoradas con los siguientes resultados: positividad en menos del 5% de las células en el 67.9% de los casos, entre 5% y 20% de positividad en el 25% de los casos y positividad mayor del 20% en el 5.4% (Tabla 19).

Tabla 19. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la inmunoexpresión de Ki-67

<i>Ki-67</i>	Nº casos	Porcentaje
Menor 5%	38	67,9
Entre 5% y 20%	14	25,0
Mayor de 20%	3	5,4
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

c) Distribución de los casos según la expresión de la proteína p53

En nuestra serie, ninguno de los melanomas uveales mostró más del 5% de células positivas frente al epitopo de la oncoproteína supresora p53.

d) Distribución de los casos según la expresión de Bcl-2

La valoración de la inmunorreactividad para Bcl-2 se hizo en dos categorías: negativo (57.1%) y positivo (41.1%) (Tabla 18).

Tabla 18. Melanoma uveal: Distribución de los casos según la inmunoexpresión de Bcl2

Bcl-2	Nº casos	Porcentaje
Negativo	32	57,1
Positivo	23	41,1
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

e) Distribución de los casos según la sobreexpresión de c-erb- B2

En ninguno de los melanomas uveales de nuestra serie observamos tinción de membrana en más del 10% de las células tumorales.

B. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

1. RELACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO CON LA PRESENCIA DE PIGMENTO MELÁNICO

La presencia de melanina afecta a los tres patrones histológicos principales en que se catalogan los casos estudiados, no obstante, el examen microscópico revela una discreta tendencia a asociarse al patrón mixto (Tabla 20), siendo esta relación estadísticamente significativa ($p=0.04$).

Tabla 20. Relación del patrón histológico con la presencia de pigmento melánico

		<i>Patrón histológico</i>				
		<i>Fusocelular</i>	<i>Epitelial</i>	<i>Mixto</i>	Total	
Melanina	<20	Recuento	16	4	2	22
		% del total	29,7%	7,4%	3,7%	40,7%
	20 -75	Recuento	7	5	6	18
		% del total	13,0%	9,3%	11,1%	33,3%
	>75	Recuento	5	1	8	14
		% del total	9,3%	1,9%	14,8%	25,9%
Total	Recuento	28	10	16	54	
	% del total	51,8%	18,5%	29,6%	100,0%	

Significación estadística: $p= 0,04$

2. RELACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO CON EL PLEOMORFISMO CELULAR/NUCLEAR

El pleomorfismo celular fue menos notorio en los tumores de patrón fusocelular, observándose un aumento del mismo en los melanomas uveales con patrón mixto y epitelial (Tabla 21).

Tabla 21. Relación del patrón histológico y el pleomorfismo celular/nuclear

		Patrón histológico				
			Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total
Pleomorfismo celular/nuclear	Escaso	Nº de casos	11			11
		% del total	1,8%			20,0%
	Moderado	Nº de casos	16	9	12	37
		% del total	29,1%	16,4%	21,8%	67,3%
	Intenso	Nº de casos	2	1	4	7
		% del total	3,6%	1,8%	7,3%	12,7%
Total	Nº de casos	19	10	16	55	
	% del total	52,7%	18,2%	29,1%	100,0%	

Significación estadística $p=0,000$

3. RELACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO CON LA PRESENCIA DE HENDIDURAS NUCLEARES LONGITUDINALES

Las hendiduras nucleares longitudinales fueron características del patrón fusocelular (Tabla 22), siendo esta relación estadísticamente significativa ($p=0.00$).

Tabla 22. Relación del patrón histológico con la presencia de hendiduras nucleares longitudinales

		Patrón histológico				
			Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total
Hendiduras nucleares longitudinales	No	Nº casos	18	10	16	44
		%	32,7%	18,2%	29,1%	80,0%
	Si	Nº casos	11			11
		%	20,0%			20,0%
	Total	Nº casos	29	10	16	55
		%	52,7%	18,2%	29,1%	100,0%

Significación estadística: $p<0,000$

4. RELACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO CON LAS MITOSIS

Los melanomas uveales de nuestra serie, independientemente del patrón histológico, presentan escaso número de figuras mitóticas (Tabla 23).

Tabla 23. Relación del patrón histológico con el número de mitosis

		Patrón histológico				
		<i>Fusocelular</i>	<i>Epitelial</i>	<i>Mixto</i>	Total	
Mitosis	<i>No identificables</i>	Recuento	23	2	1	26
		% del total	43,6%	3,7%	1,9%	48,1%
	<i>Escasas</i>	Recuento	5	6	15	26
		% del total	9,3%	11,1%	27,8%	48,1%
	<i>Frecuentes</i>	Recuento		2		2
		% del total		3,7%		3,7%
Total	Recuento	28	10	16	54	
	% del total	51,8%	18,5%	29,6%	100,0%	

Significación estadística: $p < 0,000$

5. RELACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO Y LA PROMINENCIA NUCLEOLAR

La prominencia nucleolar ligera/intensa se observó en el patrón epitelial y en el patrón mixto estando ausentes en el patrón fusiforme (Tabla 24), siendo esta relación estadísticamente significativa ($p=0.006$).

Tabla 24. Relación del patrón histológico con la prominencia nucleolar

		Patrón histológico				
		Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total	
Prominencia nucleolar	Ausencia	Nº de casos	12	1		13
		% de casos	21,9%	1,8%		23,6%
	Ligera	Nº de casos	17	6	14	37
		% de casos	30,9%	10,9%	25,5%	67,3%
	Intensa	Nº de casos		3	2	5
		% de casos		5,5%	3,6%	9,1%
Total	Nº de casos	29	10	16	55	
	% de casos	52,7%	18,2%	29,1%	100,0%	

Significación estadística: $p < 0,006$

6. RELACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO Y LA PRESENCIA DE NECROSIS TUMORAL

En las muestras estudiadas, la necrosis tumoral estuvo ausente en el 83,5% de los casos, observándose áreas de necrosis en 7 casos (2 de patrón mixto, 4 patrón fusocelular, 1 patrón epitelioide) y necrosis masiva en dos casos con patrón epitelial (Tabla 25).

Tabla 25. Relación del patrón histológico con la necrosis tumoral

		<i>Patrón histológico</i>				
		Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total	
Necrosis	Ausencia	Nº de casos	24	7	14	45
		% de casos	44,4%	13,0%	25,9%	83,50
	Area de necrosis	Nº de casos	4	1	2	7
		% de casos	7,4%	1,9%	3,7%	13,0%
	Necrosis masiva	Nº de casos		2		2
		% de casos		3,7%		3,7%
Total	Nº de casos	28	10	16	54	
	% de casos	51,8%	18,5%	29,6%	100,0%	

Significación estadística: p=0.062

7. RELACIÓN DE LAS MITOSIS Y LA FRACCIÓN PROLIFERATIVA DETERMINADA CON Ki-67

Los dos casos con mitosis frecuentes presentaron la media más alta de positividad para Ki-67 (Tabla 26); no obstante, observamos que 16 casos con mitosis no identificables o escasas mostraron índices de proliferación determinados mediante la expresión de Ki-67 entre el 5-20% (Tabla 27).

Tabla 26. Relación de la expresión de Ki-67 (media) y la presencia de mitosis

Mitosis	<i>Proliferación ki-67</i>		Desviación típica
	Nº de casos	Media	
No identificables	26	8,50	13,18
Escasas	26	10,27	16,18
Frecuentes	2	12,00	11,31
Total	54	9,48	14,45

Tabla 27. Relación entre el índice de proliferación Ki-67 y la presencia de mitosis

Mitosis		Índice de proliferación Ki-67			Total
		<5%	5%-20%	>20%	
No identificables	Nº de casos	20	4	2	26
	% de casos	37,0%	7,4%	3,7%	48,1%
Escasos	Nº de casos	16	9	1	26
	% de casos	29,6%	16,7%	1,9%	48,1%
Frecuentes	Nº de casos	1	1		2
	% de casos	1,9%	1,9%		3,7%
Total	Nº de casos	37	14	3	54
	% de casos	68,5%	25,9%	5,6%	100,0%

Significación estadística: $p > 0,50$

8. RELACIÓN DEL PLEOMORFISMO CELULAR/NUCLEAR Y LA FRACCIÓN PROLIFERATIVA DETERMINADA CON Ki-67

El índice de proliferación Ki-67 entre el 5-20% se asoció preferentemente a pleomorfismo moderado/ intenso (Tabla 28).

Tabla 28. Relación del pleomorfismo celular/nuclear con el índice de proliferación Ki-67

		<i>Índice de proliferación ki-67</i>			Total	
		< 5%	5%-20%	>20%		
<i>Pleomorfismo celular/nuclear</i>	Escaso	Nº de casos	8	3	11	
		%	14,8%	5,6%	20,4%	
	Moderado	Nº de casos	25	10	1	36
		%	46,3%	18,5%	1,9%	66,7%
	Intenso	Nº de casos	4	1	2	7
		%	7,4%	1,9%	3,7%	13,0%
Total	Nº de casos	37	14	3	54	
	%	68,5%	25,9%	5,6%	100,0%	

Significación estadística p>0,05

9. RELACIÓN DEL PLEOMORFISMO CELULAR/NUCLEAR Y LA INMUNOEXPRESIÓN DE BCL-2

La inmunexpresión de Bcl-2 estuvo asociado a melanomas uveales con pleomorfismo celular/nuclear moderado/intenso (Tabla 29).

Tabla 29. Relación del pleomorfismo celular/nuclear con la expresión de Bcl-2

		<i>Expresión de BCL-2</i>			
		Negativo	Positivo	Total	
<i>Pleomorfismo celular/nuclear</i>	Escaso	Nº de casos	7	4	11
		%	13,0%	7,4%	20,4%
	Moderado	Nº de casos	24	12	36
		%	44,4%	22,2%	66,7%
	Intenso	Nº de casos		7	7
		%		13,0%	13,0%
Total	Nº de casos	31	23	54	
	%	57,4%	42,6%	100,0%	

Significación estadística p<0,005

10. RELACIÓN DE LA PROMINENCIA NUCLEOLAR Y EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Ki-67

La prominencia nucleolar ausente/ligera estuvo asociada a índices de proliferación Ki-67 inferiores al 20% (Tabla 30).

Tabla 30. Relación de la prominencia nucleolar con la expresión de Ki-67

		<i>Índice de proliferación ki-67</i>				
		< 5%	5%-20%	>20%	Total	
Prominencia Nucleolar	Ausente	Nº de casos	10	3	13	
		%	18,5%	5,6%	24,1%	
	Ligera	Nº de casos	25	8	3	36
		%	46,3%	14,8%	5,6%	66,7%
	Prominente	Nº de casos	2	3		5
		%	3,7%	5,6%		9,3%
Total	Nº de casos	37	14	3	54	
	%	68,5%	25,9%	5,6%	100,0%	

Significación estadística $p > 0,05$

11. RELACIÓN DE LA PROMINENCIA NUCLEOLAR Y LA REACTIVIDAD PARA BCL-2

La prominencia nucleolar no mostró relación con la expresión de Bcl-2 (Tabla 31).

Tabla 31. Relación de la prominencia nucleolar con la expresión de Bcl-2

		<i>Expresión de Bcl-2</i>			
		Negativo	Positivo	Total	
Prominencia Nucleolar	Ausente	Nº de casos	9	4	13
		%	16,7%	7,4%	24,1%
	Ligera	Nº de casos	19	17	36
		%	35,2%	31,5%	66,7%
	Prominente	Nº de casos	3	2	5
		%	5,6%	3,7%	9,3%
Total	Nº de casos	31	23	54	
	%	57,4%	42,6%	100,0%	

Significación estadística $p > 0,05$

V. DISCUSIÓN

Tanto para anatomopatólogos como para oftalmólogos, el melanoma del tracto uveal sigue constituyendo un importante reto, sobre todo, porque su comportamiento biológico generalmente es imprevisible y porque ninguno de los actuales métodos de tratamiento parece mejorar la supervivencia a largo plazo. Y así, el melanoma de la úvea sigue causando importante morbilidad y mortalidad, debido a la dificultad de un diagnóstico precoz y a la escasa respuesta a la terapia. Por otro lado, para comprender la etiopatogenia del melanoma uveal se necesita aclarar una serie de importantes cuestiones, tales como: ¿por qué éste tumor maligno ocular es más frecuente en hombres que en mujeres?, ¿cuáles son los factores implicados en la iniciación de la transformación en ésta neoplasia?, ¿cuál es el momento de su progresión cuando adquiere su capacidad metastásica?, ¿por qué existe una mayor receptividad del hígado para el desarrollo de metástasis, con larga historia natural?, etc.

Lógicamente, se precisa la suma progresiva de cambios genéticos para el desarrollo del melanoma de la úvea. La implicación de más de un acontecimiento genético también es sugerida por el hecho de que se requieren muchos años para que el tumor sea clínicamente evidente. Aunque los genes específicos implicados en el proceso multiseccional son desconocidos, los genes supresores involucrados en la protección del genoma de alteraciones mutágenas juegan probablemente un papel relevante en el proceso de transformación y progresión neoplásica. A diferencia de otros tumores (incluido el melanoma cutáneo), la investigación llevada a cabo para identificar y valorar el papel de oncogenes y genes supresores tumorales en el desarrollo y pronóstico del melanoma uveal ha sido muy escasa (Levine y Broach, 1995).

La posibilidad de aplicar técnicas de biología molecular a los cortes histológicos facilita una mejor comprensión de la biología de los tumores. En este trabajo se ha pretendido observar la interrelación entre las características anatomopatológicas (histopatológicas) del tumor y los hallazgos biomoleculares (concretamente, la expresión inmunohistoquímica del Ki-67/MIB-1, p53, Bcl-2 y c-erbB-2) en un grupo de 56 melanomas uveales primitivos.

1. ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Este estudio retrospectivo se basa en las observaciones clínicas e histopatológicas de un -relativamente importante (56)- grupo de melanomas uveales tratados quirúrgicamente mediante *enucleación ocular*, en diferentes Hospitales (antes reseñados), entre los años 1975 y 2003, sin que exista constancia del empleo de otro tipo de tratamiento más conservador en dichos centros asistenciales en las fechas correspondientes. Así, pues, la enucleación ha constituido el método clásico de tratamiento de estos tumores; sin embargo, su eficacia ha sido cuestionada en los últimos años. El empleo de opciones terapéuticas más conservadoras ha significado una importante reducción del material disponible, tanto para estudio anatomopatológico convencional, como para las nuevas técnicas de biología molecular (no implantadas rutinariamente hasta hace algo más de una década). De todos modos, para muchos autores el empleo de la enucleación sólo está indicado en casos muy avanzados y las técnicas de resección local de melanomas de la úvea posterior son complejas, y aún no son empleadas de manera generalizada (Shields y Shields, 1992). El resultado de ensayos clínicos actualmente en curso nos dará la respuesta definitiva a la controvertida cuestión de la opción terapéutica más correcta.

Las series más amplias sobre los *aspectos epidemiológicos* del melanoma uveal ponen de manifiesto una ligera predilección de estos tumores por los varones (Egan y Seddon, 1988; Jensen, 1963; Mork, 1961; Rivio, 1977). En nuestro estudio, sin embargo, se encontró un ligero predominio del sexo femenino. Probablemente este dato, que contrasta con los reflejados en la literatura, sólo es debido al escaso número de melanomas estudiados. Sin embargo, un hallazgo llamativo ya puesto de manifiesto en diversas publicaciones (Egan et al., 1988; Seddon et al., 1994), es que en el rango de edad entre 20 y 40 años existe una discreta tendencia por la aparición del tumor en mujeres. En nuestro estudio observamos un considerable número de pacientes relativamente jóvenes de sexo femenino. Si agrupamos los pacientes cuyas edades conocemos (n=56) en menores de 40 años (n=11) e iguales o mayores de esta edad (n=45), encontramos que en el grupo más joven predominan las mujeres (7 mujeres vs. 4 varones) y en el de mayor edad lo hacen los varones (23 varones vs. 22 mujeres). Este hallazgo coincide con la literatura, en la que, a pesar de existir un predominio del tumor en varones entre los 20-40 años, la aparición en mujeres es algo superior .

La edad media de los pacientes de nuestra serie fue de 64'15 años, dato que concuerda con prácticamente todas las series publicadas en las que la edad media del diagnóstico oscila entre los 55-60 años (Jensen, 1963; Mork, 1961; Raivio, 1977), siendo muy rara su aparición en niños o adultos jóvenes (Egan et al. 1988; Shields y Shieds, 1992). A diferencia de otros cánceres propios de la edad adulta, se observa un descenso de su aparición a partir de los 70 años, tal como publican las series más amplias (Mork, 1961; Raivio, 1977). En nuestro estudio tan sólo 4 de 56 pacientes tenían más de 69 años y no hay ningún caso de aparición en edades inferiores a 20 años.

En cuanto a la *localización* tumoral nuestros datos también coinciden con los publicados, existiendo una marcada preferencia por la uvea posterior, en concreto la coroides (82,1%), seguida del cuerpo ciliar (10,7%), siendo muy poco frecuentes los melanomas originados en el estroma del iris (7,1%). Éstos últimos constituyen entre el 3 y el 10% de todos los melanomas de la úvea (Green, 1985; Shieds y Shieds, 1992).

De los factores predictores del pronóstico, el *tamaño* (Bernstein y Liotta, 1994) parece ser uno de los más fiables para la mayoría de los autores (McLean, 1995; Yanoff y Fine, 1996). Los melanomas malignos de menos de 1'0 cm³ (aproximadamente 6 x 6 x 6 diámetros de disco/DD o menores, clínicamente) tienen un pronóstico muy favorable (BeruBe et al., 1996; McLean et al., 1977), mientras que los de más de 1'0 cm³ tienen un mal pronóstico (Bicknell y Harris, 1996). El tamaño tumoral fue obtenido del consignado en el informe anatomopatológico de cada caso; entre ellos, la lesión había sido valorada según sus propios criterios (Binet et al, 1996), es decir, considerando únicamente el diámetro mayor. En los 53 casos de melanomas uveales en los que pudimos determinar el diámetro máximo observamos que la media de este parámetro estuvo en 2,21 cm siendo el tamaño mínimo de 1 cm y el máximo de 9 cm. Al correlacionarlo con la localización se ha observado que los melanomas uveales ubicados en iris y cuerpo ciliar fueron más grandes (3'83 y 3'18 cm, respectivamente) que los de coroides (1'97 cm). El único predictor de metástasis era el grosor tumoral superior a 7 mm, los cuales eran 2'5 veces más propensos a desarrollar metástasis que los pacientes con melanoma de cuerpo ciliar más fino.

De todos modos, aunque los melanomas del cuerpo ciliar suelen ser de mayor tamaño que los melanomas coroideos en el momento del diagnóstico, se ha observado estadísticamente que el pronóstico es peor para los melanomas de cuerpo ciliar independientemente del tamaño y tipo celular de la neoplasia (Seddon et al., 1983; McLean et al., 1987).

Respecto al *tipo celular*, la literatura (Wilder y Paul, 1951; Yannoff y Fine, 1996) presenta el tipo mixto como el más común (entre el 45 y el 48% según las series), seguido del fusiforme B (32-39%; de éstos el 5-6% son fasciculares, respectivamente), siendo menos común el tipo necrótico (7-8%), el segundo menos frecuente el fusiforme A (5-6%) y epitelioide el más infrecuente de todos (2-3%). Varios autores han correlacionado el patrón histológico con la supervivencia de los pacientes (Wilder y Paul, 1951; Yannoff y Fine, 1996). Los tumores podían ser categorizados en dos grupos pronósticos. El de mejor pronóstico, constituido por tumores fusiformes A, fusiformes B y fasciculares, experimentó una mortalidad debida a metástasis del 22%, mientras que el grupo de peor pronóstico, constituido por los tipos necrótico, mixto y epitelioide, tuvieron una tasa de mortalidad del 62% debida a metástasis (Wilder y Paul, 1951). Yannoff y Fine (1996) también resumen la clasificación y el pronóstico en dos grupos: un poco menos del 50% de los melanomas malignos del cuerpo ciliar y la coroides son de la variedad fusiforme, con un excelente pronóstico (es decir, aproximadamente, el 73% sobrevive) y algo más del 50% de los casos son de la variedad no-fusiforme (epitelioide, mixto o necrótico), con un mal pronóstico (o sea, con un 35% de supervivencia, aproximadamente).

En nuestro análisis, sin embargo, sólo se establecieron tres categorías: encontramos un predominio del tipo fusiforme, que incluyó ambos tipos A y B (n=29 51,8%), seguido de los tipos epitelioide, (n=10, 17,9%), y mixto (n=16, 28.6%). Creemos que esta disparidad de hallazgos se debe a la ausencia de consenso por parte de los patólogos oculares a la hora de valorar el tipo celular de un melanoma uveal, especialmente en el tipo mixto, puesto que ¿qué porcentaje de células epitelioides debe encontrarse en un tumor fusiforme para considerarlo mixto?. Considerando que siempre es posible el hallazgo de alguna célula epitelioide, la rigidez establecida en este criterio será el factor de mayor repercusión respecto al tipo celular más frecuente. Para este trabajo, el tumor ha sido considerado como mixto si se evidencian más del 5% de células epitelioides.

La *necrosis tumoral*, aunque no se consideró un patrón histopatológico aislado, sí fue una característica valorada en el estudio de las lesiones. Existen trabajos que atribuyen como causa de la necrosis tumoral a un posible mecanismo autoinmune; la presencia en el tumor de una numerosa población de células plasmáticas apoyaría esta hipótesis (Yanoff y Fine, 1996). Dentro de esta línea, De la Cruz et al. (1990), así como otros grupos de investigación (Folberg et al., 1993; Vit, 1983), han analizado el significado pronóstico de la infiltración linfocítica en melanomas uveales. Todos los estudios encontraron que la infiltración linfocítica estaba asociada a un peor pronóstico. La posible explicación fue sugerida por Kranda et al. (1992), que observaron un perfil anormal de gangliósidos en la superficie de las células del melanoma asociada al tipo celular mixto y a la infiltración linfocítica; ellos postulan una relación entre malignidad y antigenicidad.

En nuestra serie, pudimos comprobar la ausencia de fenómenos de necrosis fue la tónica dominante (45 casos, 80,4%), observándose áreas necróticas en 7 casos (12,5%) y sólo 3 casos (5,4%) mostraron una necrosis tumoral masiva.

La presencia de necrosis tumoral, en áreas o de forma masiva, estuvo presente en los tres patrones histológicos considerados (fusocelular, epiteliode, mixto). Podríamos pensar que los tumores fusiformes, de menor agresividad biológica, tendrían tiempo y oportunidad de alcanzar un gran tamaño tumoral y la vascularización intratumoral, factor implicado en el pronóstico (Folberg et al., 1992; Folberg et al., 1993) e imprescindible para aportar oxígeno y nutrientes, resultaría insuficiente en lesiones de excesivo tamaño, ocasionando áreas de necrosis.

Una de las características citoplasmáticas analizada fue la presencia de *melanina*. Algunos tumores son completamente amelanóticos (Bissonnette et al., 1992), otros son extremadamente pigmentados y otros muestran pigmentación variable (Yanoff y Fine, 1996). Para algunos autores la pigmentación representa un factor pronóstico (McLean et al., 1977; Schwartzman et al., 1993; Yanoff y Fine, 1996), considerándose en general que los tumores ligeramente pigmentados tienen mejor pronóstico que los densamente pigmentados. Pero, éste parámetro no constituye un criterio muy fiable, ya que la pigmentación puede variar enormemente de célula a célula, de zona a zona y de tumor a tumor, por lo que, a menos que se realicen cortes

seriados de la pieza, se puede ver sólo la parte pigmentada o la no pigmentada (amelanótica) del crecimiento neoplásico.

En los casos aquí estudiados, se advertía melanina en casi todos las cortes realizados, aunque su presencia variaba notablemente de unos melanomas a otros. En los casos donde había melanina (en cantidad escasa, moderada o intensa/masiva), ésta presentaba una marcada heterogeneidad, tanto en su distribución (siendo posible encontrar células que no poseían melanina, ni un gránulo, incluso en los casos, por otro lado, más pigmentados) como en su intensidad.

Aunque la presencia de melanina afectaba a todos los patrones histológicos en que se catalogaron los casos estudiados, parecía presentar una discreta tendencia a asociarse a los patrones mixto y fusiforme. La posible interpretación de estos datos es que los tumores cuyas células poseen un mayor grado de diferenciación, sin lugar a dudas los de tipo fusiforme, presentan gránulos de melanina en mayor cuantía.

Bajo nuestro punto de vista, la interpretación intuitiva de éste fenómeno sería que los procesos tumorales suelen asociarse a una serie de cambios orientados hacia la indiferenciación celular, y las células tumorales que presentan gránulos de melanina sugieren, tanto por su aspecto celular como por su comportamiento frente a los anticuerpos empleados, la conservación de un mayor grado de diferenciación respecto a otras células con gránulos escasos o ausentes.

Además de las células melanocíticas tumorales descritas, se han observado dos tipos más cuya naturaleza u origen no está muy claro:

a) Uno de éstos se encuentra normalmente agrupado alrededor en zonas de necrosis o en el interior de áreas necróticas. Su citoplasma es grande, redondeado, con numerosos gránulos de color ocre, y posee un núcleo muy irregular (observado tras el blanqueo con peróxido). No se relaciona con el patrón histológico, excepto en los tumores con signos necróticos. Este tipo es muy probablemente una célula tumoral.

b) El otro tipo celular es similar al anterior pero su localización no son las áreas necróticas sino que lo hace preferentemente en las áreas de tejido conectivo, siendo en cierto modo habitual encontrarlas de forma aislada o próximas a vasos sanguíneos. Su contenido en melanina es considerable, con gran abundancia de gránulos de gran tamaño que le confieren una intensa tonalidad oscura, casi negra. Estas células crean bastantes más dudas respecto a su origen, no pareciendo células tumorales y pudiendo incluso tratarse de macrófagos repletos de melanina.

La clasificación de Callender modificada, con los tipos celulares presentes en el melanoma uveal, sigue siendo uno de los factores básicos del pronóstico a pesar de su falta de reproducibilidad. Diversos investigadores (Gamel et al., 1978; Gamel et al., 1982; Gamel et al., 1983; McQuurdy et al. 1991) han estudiado técnicas para hacer más fiables y reproducibles los datos citológicos. Tras obtener las medidas de área, circunferencia, espesor y longitud de núcleo y nucleolo realizaron un análisis estadístico que puso de manifiesto dos observaciones importantes: 1ª) la medida del tamaño nucleolar predecía mejor la evolución del paciente que la medida del tamaño nuclear, 2ª) la desviación estándar de cualquiera de las variables era mejor factor predictivo que la media. Esto significaba que el dato pronóstico más importante en el examen histopatológico no era la forma de la célula, sino el tamaño y la variabilidad de éste en los nucleolos (McLean et al. 1983).

El estudio histopatológico realizado en este trabajo incluyó entre sus observaciones las *características nucleares y nucleolares*. Se pudo observar que las células fusiformes solían presentar un tamaño más pequeño, una cromatina más compacta y no se observaba nucleolo o se hacía con bastante dificultad. Estas células parecían mostrar cierta tendencia a localizarse en la periferia del tumor, tal vez por corresponder a zonas en las que se había preservado mejor la muestra, influenciada por los niveles nutricionales que son muy reducidos en las áreas centrales de tumores grandes. En las células epitelioides los núcleos presentaban una cromatina laxa, de localización periférica, con un granulado muy fino (que daba el aspecto de que faltase cromatina), con un nucleolo siempre evidente y de tonalidad eosinofílica (Callender et al, 1942; Callender, 1993).

Pudo también observarse que estos tumores presentan una elevada incidencia de núcleos en picnosis o con los contornos muy irregulares. Tal vez este hallazgo, junto con las características de la cromatina mencionadas anteriormente, pudieran ser los causantes de los problemas encontrados para la inmunodetección de las proteínas que se localizan a nivel nuclear, p-53 y Ki-67/MIB-1. Posiblemente se trata de la razón principal de las tinciones tenues o muy tenues que se han apreciado.

McLean et al. (1977) fueron los primeros en demostrar el valor pronóstico de contar las figuras de *mitosis* en los melanomas de la úvea. Estos autores descubrieron que los melanomas uveales generalmente contienen pocas figuras mitóticas, por lo que recomendaron que fuesen revisados un mínimo de 40 campos de gran aumento (CGA). Otros grupos de investigadores también han confirmado el valor pronóstico del índice mitótico (De la Cruz et al., 1990; Folberg et al., 1993; Seddon et al., 1994).

El recuento de figuras de mitosis en las lesiones estudiadas se realizó según el número de mitosis por campo de gran aumento. Sin embargo, no fueron seleccionados varios CGA de forma aleatoria sino que se realizó una revisión completa de toda la muestra, procesada y teñida de forma habitual (H-E), y se dividió por el número de CGA presentes en ésta.

Es preciso relacionar los resultados con otras variables histopatológicas o inmunohistoquímicas:

-Desde la clasificación citológica inicial, los tres tipos celulares reconocidos en el melanoma uveal han mostrado distinto número de mitosis al observar sus núcleos: en los de las células fusiformes raramente se identifican mitosis; y los de células epitelioides y mixto las presentan de manera más frecuente (McLean, 1995; Shields y Shields, 1992; Yanoff y Fine, 1996; Zimmerman, 1986).

- Nuestras observaciones se ajustaron a la literatura existente: el patrón epitelioides presentaba un índice mitótico más elevado que el fusiforme, aunque no hay que olvidar la mejor visualización de la muestra que ocurre en el primero, en el que las células son grandes, poco cohesivas, con límites definidos, y con núcleos grandes y ovales, con nucleolos prominentes. El análisis estadístico del cruce de estos parámetros aporta resultados estadísticamente significativos.

-Asímismo, se pudo apreciar un discreto aumento del número de mitosis en las zonas periféricas tumorales. Tal vez sea debido a una mejor conservación de la muestra, aunque, como mencionamos previamente, se ha señalado en la literatura que la expresión del antígeno Ki-67/MIB-1 (que se trata de un marcador de células en fase proliferativa y, por tanto, directamente relacionado con la visualización de mitosis) puede estar muy influenciada por los niveles nutricionales de la célula, de modo que las áreas centrales de tumores grandes, con perfusión escasa, pueden dar lugar erróneamente a niveles bajos de marcaje de Ki-67/MIB-1 o recuentos bajos de mitosis.

Respecto a las características nucleares, los casos que exhibían células con núcleos abigarrados (más pleomórficas) presentaban una mayor índice mitótico, apareciendo éstas con mayor frecuencia en las células menos diferenciadas o más afectadas por el proceso tumoral. El melanoma uveal presenta generalmente una alta incidencia de núcleos en picnosis o con los contornos muy irregulares; esto supone una dificultad adicional en la determinación del número de mitosis.

2. ASPECTOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y BIOMOLECULARES

Los recientes avances en el diagnóstico y tratamiento del melanoma uveal tienen como objetivo preservar el ojo y la visión, sin embargo la posible aparición de recidivas tumorales y/o metástasis siguen siendo un problema sin resolver. Para salvar estas limitaciones son numerosas las publicaciones que intentan asociar ciertas características biomoleculares con la agresividad en los diferentes tipos de melanomas uveales (Conway RM et al, 2003; Chowers I et al, 2002; Sector EA et al, 2002).

En nuestro estudio, al aplicar el panel característico de diferenciación de los melanomas malignos con proteína S-100, HMB-45 y melan A observamos que los melanomas de la úvea presentan el mismo patrón de inmunotinción que los melanomas cutáneos.

El estudio de la expresión de oncoproteínas, genes supresores y marcadores de proliferación como p53, bcl-2, c-erb-B2 y Ki-67, en cortes tisulares, ha sido ampliamente estudiado en distintos tipos de tumores sólidos con resultados muy dispares sobre su utilidad como factores pronósticos.

Proteína p53

Es bien conocido el papel y la importancia de la proteína p53 en el control y regulación de la proliferación celular siendo, la expresión de proteína mutada o alterada y la disfunción de la proteína normal, las anomalías más comunes halladas entre los eventos iniciales que ocurren en el proceso de transformación neoplásica (Levine et al, 1991; Tobal et al. 1992). Revisada la literatura referente a los melanomas uveales, observamos que los datos que existen al respecto son poco concluyentes.

Tobal et. al (1992) estudiaron, con técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, la expresión de p53 en lesiones uveales: 18 melanomas de coroides (16 congelados, 2 incluidos en parafina), 7 nevus de coroides (parafina), 5 ojos elevadamente pigmentados (parafina), y 2 ojos normales (congelados). En 12 de los 18 melanomas malignos de coroides observaron alta expresión de proteína p53 mutante; no obstante en los nevus de coroides en ninguno se observó expresión de p53.

En nuestra serie, ninguno de los melanomas uveales mostró más del 5% de células positivas frente a p53. Estos resultados están en consonancia con los publicados por Aliaga et al. (1996) en melanomas coroideos en los que ninguno de ellos demostró positividad para p53. Los autores discuten la posibilidad de que la alteración existente, ya sea en el gen p53 o en su producto, no fuese detectable por el anticuerpo monoclonal utilizado.

La comparación de los estudios que emplean la detección inmunohistoquímica de p53 en cortes de tejido presentan algunas dificultades inherentes al método, porque no todos los trabajos utilizan el mismo anticuerpo monoclonal y está demostrado que no todas las clonas de anticuerpo tienen la misma inmunoreactividad, aunque la clona que reconoce la secuencia más larga y menos sensible a los procesos de fijación sea la DO7 (Kroumpouzos et., 1994; Lassam et al., 1993; McGregor y Yu, 1993; Stretch et al., 1991; Vogt et al., 1997; Weiss y Cavenée, 1993).

Aun así, autores como Janssen et al. (1996) estudiando la expresión de proteína p53 en 43 melanomas de coroides con cuatro clonas de anticuerpo diferentes frente a distintos epítomos de p53 (CM-1, DO-7, Pab1801, PAb240) obtuvieron los siguientes resultados:

- Cinco de 43 pacientes (1.6%) mostraron más del 10% de núcleos p53-positivos.
- Dieciocho pacientes (41.9%) presentaron unos pocos núcleos positivamente teñidos con al menos uno de los anticuerpos empleados. La expresión p53 fue encontrada, sobre todo, en tumores de células epiteloides, no encontrándose correlación entre la expresión de p53 y la evolución clínica.

Los autores interpretan estos resultados concluyendo que la expresión de la oncoproteína p53 en el melanoma de coroides sería un suceso tardío en la progresión del tumor. Esta hipótesis está apoyada por el hallazgo de que todos los tumores con inmunoexpresión de p53 habían recibido irradiación preoperatoria, lo que podría haber causado alteraciones genéticas y secundariamente su demostración inmunohistoquímica.

Chowers et al. (2002), describen en una serie de 94 melanomas uveales la positividad de p53 en 14 casos asociados a un mayor índice proliferativo.

Algunos trabajos muestran estudios sobre la detección mutaciones a nivel de la secuencia del gen p53. De la Paz et al. (1992) han analizado el gen p53 en el DNA tumoral de 50 melanomas de coroides, empleando una combinación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un análisis del polimorfismo conformacional de cadena simple (“SSCP=single-strand conformational polymorphism analysis”), no obteniendo resultados concluyentes.

La disfunción de p53 no sólo es la alteración más común en el cáncer humano, sino que también corresponde a una de las más frecuentes mutaciones en un gen aislado. Tomados en conjunto, los datos sugieren que la inactivación mutacional de p53 no sería el suceso inicial, pero que p53 podría estar implicada en la progresión del melanoma uveal. La inactivación de p53 sería esencial en la progresión de la célula névica desde benigna a maligna. Su detección un escaso porcentaje de los casos hacen pensar que se trata de una mutación adquirida de forma tardía; es decir, finalmente,

quizás después de años, la célula névica o melanocítica sufriría una mutación en p53 reduciendo su capacidad para protegerse de lesiones genéticas adicionales.

c-erb-B2

Entre los receptores tirosín-quinasa se analiza el papel del c-erb-B2. El producto del gen c-erbB-2 (gen neu o Her-2), es una glicoproteína transmembrana de 185 kD; se trata de un receptor polipeptídico de factor de crecimiento con estructura muy similar con el receptor para el factor de crecimiento epitelial (EGFR) (hallándose un 50% de homología). Sin embargo no tiene capacidad para unirse al EGF ni al TGF- β siendo su ligando el NAF (NEU activating factor). La activación mutacional del producto del gen c-erb-B2, la proteína p185^{c-erb-B2}, implica su capacidad para simular la interacción ligando-receptor a través de una dimerización de manera constitutiva en ausencia de ligando 3. Su amplificación se ha relacionado con distintas neoplasias humanas, principalmente de mama. Aunque no se ha determinado definitivamente la relación entre la amplificación de la proteína y la biología del cáncer, sí parece demostrada su asociación a un pobre pronóstico en ciertos carcinomas. La sobreexpresión del oncogén c-erb-B2 se correlaciona con un mal pronóstico en el carcinoma de mama especialmente y también en el carcinoma de ovario.

Aunque la activación de p185^{c-erb-B2} en melanoma cutáneo (MMC) ha sido investigada, no ha sido demostrado un papel causal en su patogénesis (Natali et al., 1994). Kraehn et al. (1995) encontraron niveles similares de mRNA en nevus benignos y en melanomas, con expresión incluso más elevada en epidermis normal, sugiriendo una función en la proliferación y diferenciación de las células epidérmicas, pero no en las lesiones melanocíticas.

En un trabajo realizado por Aliaga et al. (1996) que estudiaba la inmunorreactividad de diversos oncogenes en cinco-melanomas uveales, ninguno de los tumores expresaba positividad para el c-erb-B2. Langmann et al. (1993) tampoco obtuvieron resultados positivos al estudiar la expresión de ciertos oncogenes y oncoproteínas, entre ellos c-neu o c-erb-B2, en melanomas oculares.

El hecho de que todos nuestros casos hayan resultado negativos hace pensar que las alteraciones en estos receptores de membrana celular no sea un hecho relevante en la carcinógenesis. No obstante, limitaciones de cualquier técnica y el número de melanomas estudiados, no permiten que podamos realizar conclusiones definitivas.

Bcl-2

Recientes estudios han demostrado que células mesenquimales, epiteliales y neurales, así como células hematopoyéticas, se hacen más resistentes a la muerte celular programada cuando expresan Bcl-2. La proteína Bcl-2 es expresada en diversos órganos epiteliales en los que ocurre muerte celular programada durante la renovación (“turnover”) tisular normal, con expresión predominante en células epiteliales de larga vida que se consideran células progenitoras (stem-cells) de ese órgano. La proteína Bcl-2 está también topográficamente localizada en tejidos con células de larga supervivencia postmitótica, como las neuronas. En definitiva, Bcl-2 se encuentra restringida topográficamente a poblaciones celulares de larga duración o proliferantes.

Los melanocitos epidérmicos normales, así como los nevi y melanomas cutáneos, expresan Bcl-2. En un estudio llevado a cabo por Van den Oord et al., 1994 la tinción frente a Bcl-2 disminuía en el componente dérmico profundo de los nevi y fue más débil en los melanomas metastásicos. Saenz-Santamaría et al. (1994) encontraron elevados niveles de marcaje tanto en nevi como en melanomas. Cerroni et al. (1995) publicaron una expresión de Bcl-2 en el 93.1% de los MMC y en el 94.3% de los nevi benignos. Estos tres grupos de investigadores sugirieron que la expresión de Bcl-2 es un hallazgo común en las lesiones melanocíticas cutáneas, incluido el MMC, y es independientemente de su conducta biológica.

La expresión de Bcl-2 detectada en melanocitos cutáneos normales que tienen muy baja actividad proliferativa es aún escasamente entendida, aunque su presencia constante parece intervenir en la regulación de la muerte celular en la línea melanocítica. La expresión generalizada de esta oncoproteína en melanocitos epidérmicos normales, así como en nevi y melanomas en virtualmente todas las

células sugiere que no puede estar implicada en la transformación maligna de las células névicas ni puede ser empleada como marcador de malignidad en lesiones melanocíticas (Saenz-Santamaría et al., 1994); tal vez podría ser un mecanismo que rescate de la apoptosis (Smith et al., 1991), aunque si Bcl-2 tiene algún otro papel además de la inhibición de la apoptosis éste permanece desconocido hasta el momento presente.

Por otro lado, los trabajos que intentan aclarar el significado pronóstico de la expresión de Bcl-2 son también contradictorios. Mientras algunos grupos, como Grover et al. (1996), consideran que Bcl-2 puede estar implicada en un mal pronóstico, otros, como Cerroni et al. (1995), consideran que el frecuente hallazgo de Bcl-2 en lesiones melanocíticas cutáneas de diversa conducta biológica excluiría un significado pronóstico.

El oncogén Bcl-2 también ha sido estudiado en el melanoma maligno uveal (MU), aunque al revisar la literatura sólo pudimos encontrar un único trabajo sobre la expresión de Bcl-2 en melanomas uveales. Éste, realizado recientemente por Jay et al. (1996), evalúan la expresión del proto-oncogén Bcl-2 en 20 melanomas malignos de úvea (19 de coroides y 1 de cuerpo ciliar) mediante técnicas IHQ, empleando el Ac monoclonal para la oncoproteína Bcl-2 y el marcador de proliferación celular MIB-1 frente a Ki-67. Este estudio preliminar mostró que estos tumores expresaban Bcl-2 en elevado grado (en el 100% de los casos), y que la expresión no estaba correlacionada con el subtipo histológico; tanto melanomas fusiformes tipo A de bajo grado como melanomas tipo mixto de alto grado de malignidad fueron inmunopositivos. Tampoco hubo correlación positiva con el índice proliferativo MIB-1.

Adicionalmente, la positividad identificada en las neuronas de la retina (en 11 casos) estaba en línea con la expresión publicada de Bcl-2 en las neuronas postmitóticas (Hockenbery et al. 1991; Hockenbery et al. 1991b).

La positividad de Bcl-2 en melanomas uveales tanto de alto como de bajo grado, hace que el significado pronóstico de la expresión de Bcl-2 sea incierto. Sin embargo, los melanocitos coroides normales no expresaron bcl-2, quedando confinado sólo a

células tumorales y sugiriendo un papel del proto-oncogén Bcl-2 en la evolución de este tipo de tumores. Los resultados de este trabajo sugieren que la expresión alterada de Bcl-2 es común en los melanomas de úvea y que no está relacionada con el grado histológico del tumor (Hockenbery et al. 1991; Jay et al., 1996).

En nuestro estudio la inmunotinción para Bcl-2 fue positiva en 23 casos (41,1%), aunque la distribución e intensidad fue heterogénea. La heterogeneidad celular era menos evidente dentro de una disposición histológica definida, aunque cuando se apreciaba sucedía casi siempre en células epitelioides, y más aún en células de disposición libre. Coincidiendo con otros autores, a nuestro juicio los resultados sugieren que la expresión de Bcl-2 es un hallazgo común en lesiones melanocíticas uveales independientemente de su patrón celular y su conducta biológica, siendo un co-mecanismo del crecimiento celular neoplásico más frecuente de lo que había sido previamente reconocido, y que la detección de Bcl-2 en la gran mayoría de los melanomas uveales parece excluir un significado pronóstico.

Ki-67

En los estudios sobre la cinética del crecimiento tumoral se ha comprobado que el ciclo celular tiene las mismas fases y duración que en las células normales, y que la tasa de crecimiento tumoral depende de dos factores, la fracción de crecimiento (% de células en el compartimento replicativo) y el grado de desequilibrio entre producción y pérdida celular.

La frecuencia de mitosis es un reflejo grosero de la tasa de crecimiento.

La rapidez de proliferación y crecimiento tumoral del melanoma uveal es desconocida. Un grupo de investigadores dirigidos por Kroll et al. (1992) analizaron la duración de la fase S del DNA en el ciclo de la célula del melanoma estudiando melanomas uveales enucleados tras inyecciones "in vivo" de bromodeoxiuridina (BrdUrd) y yododeoxiuridina (IUDR). Los 49 pacientes recibieron inyecciones intravenosas de BrdUrd y/o IUDR a diversos intervalos previos a la enucleación. Los índices de marcaje en estos melanomas uveales oscilaron entre 0.4 y 6.3% y se

correlacionaban con las mitosis por campo de gran aumento. Se observaba una tendencia en los tumores de mayor diámetro a tener mayores índices de marcaje. No hubo correlación entre índices de marcaje y tipo celular. La duración de la fase S se encontró entre 9.4 y 16.7 horas (media=13.3 horas). No se observó relación entre la duración de la fase S con los índices de marcaje ni con las mitosis por campo. Los autores concluyen que los melanomas uveales tienen relativamente pocas células en fase activa del ciclo en un momento determinado, y que la duración de la fase de síntesis de DNA del ciclo celular parece ser similar a la de otros tumores mesenquimales (Kroll et al., 1992).

En diversos tumores, entre ellos los tumores melanocíticos cutáneos, se ha demostrado que la actividad proliferativa está estrechamente relacionada con el grado de malignidad. Por esta razón los parámetros de proliferación han sido ampliamente estudiados mediante diversas técnicas: recuento mitótico, recuento de metafases interrumpidas por vincristina, tasa de células marcadas con timidina tritiada, cuantificación de ADN por técnicas de citometría de imagen y de flujo, y mediante la caracterización inmunohistoquímica de antígenos específicos del ciclo celular que facilitan la valoración de la fracción de crecimiento del tumor (Smolle et al., 1989).

Hace algunos años se publicaron estudios de la tasa proliferativa en células de melanoma cutáneo mediante autoradiografía tras la incorporación de timidina tritiada (Pierard y Pierard-Franchimont, 1984).

Smolle et al. (1989) concluyen en sus estudios que el anticuerpo frente a Ki-67 es especialmente valioso porque marca un antígeno nuclear que se expresa en las fases G1 tardía, S, G2, y M, pero está ausente en las fases G0 y G1 (Smolle et al., 1989).

En un estudio paralelo, el mismo grupo de autores examina inmunohistoquímicamente tumores con anticuerpos monoclonales frente a Ki-67 y OKT9, otro marcador inmunohistoquímico de proliferación, ya que se une al receptor de la transferrina (TRF) -una glicoproteína de superficie que se expresa selectivamente en las células proliferantes (Soyer et al. 1989).

El grupo de Vogt et al. (1997) estudiaron la inmunotinción frente a la proteína p53 y el antígeno Ki-67 en melanomas cutáneos nodulares. Concluyeron que la valoración de la inmunorreactividad frente a los antígenos citados resulta de gran

utilidad para identificar individuos con melanomas nodulares gruesos que tienen un riesgo más elevado de enfermedad metastásica.

Ward et al. (1994) estudiaron la expresión del PCNA y lo relacionaron con el tiempo de supervivencia. El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) es un cofactor de la DNA-polimerasa-8. Se trata de un antígeno nuclear de 36kD expresado en la fases G1 tardía y S del ciclo celular. Es reconocido por el Ac monoclonal PC10 y sirve como marcador de células en proliferación en algunos tumores. Tal vez como resultado de la sobre-expresión antigénica debida a disrregulación genética o a la larga vida media del PCNA, la relación entre la expresión del PCNA y la proliferación celular se pierde. En definitiva, en los casos de melanoma uveal estudiados no pudo ser demostrada relación entre la actividad proliferativa (medida por tinción frente al PCNA) y la tasa de curación. Sin embargo, en algunos casos fué detectada una relación inversa entre la actividad proliferativa del tumor primario y el tiempo de supervivencia del paciente-

Doepner et al. (1994) estudiaron además del PCNA, las regiones organizadoras nucleares teñidas con plata (AgNORs). Como se ha comentado, el PCNA es un antígeno nuclear expresado en la fase G1 tardía y fase S del ciclo celular y reconocido por el Ac monoclonal PC10. Las regiones organizadoras nucleolares (NORs) son asas de DNA. El recuento medio de Nors teñidas con plata (AgNORs) ha sido demostrado de utilidad en la valoración del potencial maligno de los melanomas de coroides. En el trabajo de Doepner fueron estudiados 17 melanomas de coroides de ojos enucleados. En cada espécimen fue realizado un recuento del número de células PCNA positivas existentes entre 1000 células tumorales aleatoriamente seleccionadas, y la tasa de positividad fue expresada como porcentaje. Los AgNORs fueron contados en un grupo de 100 células tumorales proporcionando una media del recuento de AgNORs para cada sección. Para la evaluación estadística fue realizado un análisis de regresión lineal. Encontraron una media de 6.8 AgNOR por célula, así como elevados niveles de inmunorreactividad frente al PCNA, con una media del 38% de células PCNA positivas por sección. No hubo correlación entre la tinción PCNA y el recuento AgNORs. Aunque el inmunomarcaje de PCNA con el AcMn PC10 es un método eficaz para identificar tejido en proliferación, tiene utilidad limitada para la cuantificación exacta de la actividad proliferativa en melanomas de coroides.

Aliaga et al. (1996) estudiaron el valor de las técnicas de biología molecular en cinco melanomas de coroides, centrándose en la utilidad de las técnicas inmunohistoquímicas frente a p53, c-erb-B2, PCNA y AgNORs. El trabajo pretendía valorar las técnicas inmunohistoquímicas correlacionándolas con los criterios clásicos basados en la histología. Ninguno de los tumores expresó positividad para c-erb-B2 ni para p53. Todos los tumores mostraron positividad variable para PCNA, y los resultados de la inmunotinción frente a las AgNORs ofrecieron datos superponibles a los anteriores, es decir, positividad variable.

Langmann et al. (1993) estudiaron en varios melanomas intraoculares el perfil de expresión de oncogenes y marcadores de proliferación. En este estudio 9 melanomas uveales, 1 melanoma de iris y 1 melanoma conjuntival fueron evaluados en su actividad proliferativa con el AcMc frente a la proteína Ki-67. La expresión de las oncoproteínas c-neu (dominio interno y externo) y ras (isoformas mutadas y no-mutadas) fueron también analizadas mediante AcMcs. En el caso de melanomas metastásicos fueron evidentes una expresión significativa de la proteína Ki67 y una marcada expresión de las oncoproteínas ras, p21 y pan-ras. Todos los demás melanomas mostraron menor proliferación junto con un patrón de expresión de oncoproteínas más moderado. Respecto a los resultados de los marcadores de proliferación los tumores fueron heterogéneos; células aisladas o en acúmulos pueden jugar un papel en el pronóstico del tumor si hay una intensa reacción inmunohistoquímica. La influencia de los criterios histomorfológicos, p.ej. tipo celular, parece ser de menor importancia comparada con los criterios inmunohistoquímicos.

En nuestro estudio la proliferación celular fue estudiada empleando el AcMc MIB-1 frente a Ki-67 como marcador de proliferación. La proteína Ki-67 exhibe una localización nuclear específica, por lo que la reactividad frente a Ki-67 se pudo reconocer como una tinción nuclear de las células tumorales, generalmente más intensa en el nucleolo aunque también se observó con frecuencia una tinción nuclear difusa.

Prácticamente todos los melanomas uveales mostraron expresión nuclear de Ki-67 (positividad en menos del 5% de las células en el 67.9% de los casos, entre 5% y 20% de positividad en el 25% de los casos y positividad mayor del 20% en el 5.4%).

La heterogeneidad, tanto en la intensidad como en la distribución de la tinción fue un hallazgo constante. Parece que la frecuencia de núcleos en picnosis, con irregularidades nucleolares, así como la presencia de una cromatina laxa, periférica, de gránulo fino, hace que en ocasiones sea muy difícil apreciar la inmunotinción. En definitiva, prácticamente ningún caso deja de tener núcleos con inmunorreacción positiva, siendo esto un hallazgo normal. Sin embargo, una presencia aumentada no es frecuente.

En general, la inmunotinción frente a Ki-67 se aprecia por toda la muestra, pero quizás algo más en el tercio medio y en el tercio periférico. En las masas o nidos celulares es así mismo más frecuente en su zona periférica. Como se ha señalado previamente, la expresión del antígeno Ki-67 puede estar notablemente influenciada por los niveles nutricionales de la célula, de modo que muestras tomadas de las áreas centrales de tumores grandes, donde la perfusión y el aporte de oxígeno y nutrientes son escasos, pueden dar lugar erróneamente a niveles bajos de marcaje.

Los índices de proliferación determinados con Ki-67 se correlacionaron positivamente con la cuantificación de las mitosis por campos de gran aumento. Así los tumores con pocas mitosis identificables presentaron índices medios de células proliferantes por debajo del 5%. Estos resultados son semejantes a los descritos en la literatura por otros autores (Chowers et al., 2002).

En resumen, parece haber un número bastante amplio de posibles parámetros biomoleculares implicados en el melanoma maligno de úvea. Una vez que se hayan identificado con precisión sería de considerable interés determinar si éstos están involucrados en el desarrollo o en la progresión del tumor, así como su utilidad en el pronóstico, en el diagnóstico precoz y en la valoración de la susceptibilidad a esta enfermedad. El conocimiento de la expresión de ciertas proteínas así como sus posibles alteraciones parece tener un futuro esperanzador gracias a la aplicación de las modernas técnicas de biología molecular a los cortes histológicos. Dentro de éstas, la inmunohistoquímica resulta ser una técnica económica y de fácil aplicación en la rutina diaria.

VI. CONCLUSIONES

1ª. En la serie estudiada, la edad de los pacientes con melanoma de la úvea oscila entre 20 y 82 años, con una media global de 64'1 años, existiendo un ligero predominio en el sexo femenino.

2ª. La localización del melanoma del tracto uveal muestra una marcada preferencia por la coroides, seguida a gran distancia por el cuerpo ciliar y por el iris.

3ª. El tamaño, establecido con criterios anatomopatológicos (según su diámetro mayor), es menor en los melanomas de coroides que en los ubicados en el iris o en el cuerpo ciliar.

4ª. En los melanomas uveales, se advierte un predominio del tipo celular fusiforme, seguido en frecuencia por el mixto y, a continuación, por la variante epitelioides.

La disparidad de estos datos con algunas otras series se debe a la falta de consenso entre los patólogos para catalogar un melanoma uveal como tipo mixto. Estimamos que el porcentaje de células epitelioides superior al 5% es el requisito más adecuado para clasificar como mixto a un melanoma uveal.

5ª. La melanina muestra mayor tendencia a presentarse en las neoplasias uveales fusocelulares. Este hallazgo está en relación con el mayor grado de diferenciación celular de los mismos.

6ª. El número de mitosis es mayor en los melanomas de tipo epitelioides y menor en los constituidos por células fusiformes.

7ª. El perfil inmunohistoquímico de los melanomas uveales (positividad a la vimentina, HMB-45 y melan-A) es semejante al de los melanomas primitivos cutáneos.

8ª. En los melanomas uveales existe correlación entre el número de mitosis y la inmunotinción positiva para Ki-67/MIB-1, si bien el índice no es elevado.

9ª. La escasa o nula expresión inmunohistoquímica de p53 y c-erb-b2, en los casos estudiados, no permite establecer ninguna relación con otros marcadores de comportamiento biológico del melanoma uveal.

10ª. La inmunotinción con Bcl-2, aunque positiva en un elevado número de casos (sobre todo cuando existe mayor atipia y pleomorfismo celular) presenta una distribución e intensidad heterógena. Su valor es, pues, muy limitado en el melanoma uveal, puesto que además no se correlaciona con otros parámetros histopatológicos de probable significado pronóstico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsson M: Malignant melanoma of the choroid and ciliar body 1956-1975. En: Halland y Gothenburg. Incidence, histopathology and prognosis. *Acta Ophthalmol* 1983;6:600-610.
- Adams JM, Cori S. Life or death decisions by Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001;26:61.
- Affeldt JC, Minckler DS, Azen SP, Yeh L. Prognosis in uveal melanoma with extrascleral extension. *Arch Ophthalmol* 1980;98:1975-1979.
- Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG. Overexpression of c-erbB-2 and c-myc but not c-ras, in canine melanoma cell lines, is associated with metastatic potential in nude mice. *Anticancer Res* 1993;13:1365-1372.
- Akslen LA, Morkve O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. *Int Cancer* 1992;52:13-16.
- Albert DM. The association of viruses with uveal melanoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1979;77:367-421.
- Albert DM, Chang MA, Lamping K, Weiter J, Sober A. The dysplastic nevus syndrome. A pedigree with primary malignant melanomas of the choroid and skin. *Ophthalmology* 1985;92:1728-1734.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula*. 2ª edición (española). Barcelona. Ediciones Omega; 1992.
- Albino AP, Fountain JW. Molecular genetics of human malignant melanoma. *Cancer Treat Res* 1993;65:201-255.
- Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, Palmer JM, Hayward NK. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 1994;4:35-45.
- Albino AP. Genes involved in melanoma susceptibility and progression. *Curr Opin Oncol* 1995;7:162-169.
- Aliaga JJ, Bemet E, Morais R. Estudio del valor pronóstico de algunas técnicas de biología molecular en cinco melanomas de coroides. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996;71:469-474.
- Alnemri ES, Robertson NM, Fernandes TF. Overexpressed full-length human BCL-2 extends the survival of Baculovirus-infected Sf9 insect cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7295-7299.
- Anastassiou G, Tschentscher F, Zeschnigk M. Prognostically relevant markers of malignant melanoma. *Ophthalmologie* 2002; 99:327-332.
- Anónimo: Mortality in patients with small choroidal melanoma. COMS report nº.4 The Collaborative Ocular Melanoma Study Group. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:886-893.
- Anónimo: The collaborative ocular melanoma study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma II: Initial mortality findings. COMS report nº.10 *Am J Ophthalmol* 1998; 125:779-796.
- Anónimo: Histopathologic characteristics of uveal melanoma in eyes enucleated from COMS report nº.6 *Am J Ophthalmol* 1998; 125:745-766.
- Arentsen JJ, Green WR. Melanoma of the iris: report of 72 cases treated surgically. *Ophthalmic Surg* 1975;6:23-37.
- Atkinson B, Ernst CS, Ghrist BF, Herlyn M, Blaszczyk M, Ross AH, Herlyn D, Steplewski Z, Koprowski H. Identification of melanoma associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res* 1984;44:2577.

- Augsburger JJ, Gamel JW, Shields JA. Cobalt-60 plaque radiotherapy vs. enucleation for posterior uveal melanoma: Comparison of survival by prognostic index groups. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1979;87:741-760.
- Augsburger JJ, Eagle RC Jr, Chiu M, Shields JA. The effect of pre-enucleation radiotherapy on mitotic activity of choroidal and ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 1987;94:1627-1630.
- Augsburger JJ, Gamel JW, Lauritzen K, Brady LW. Cobalt-60 plaque radiotherapy vs. enucleation for posterior uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1990;109:585-592.
- Augsburger JJ, Gamel JW. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;66:1596-1600.
- Augsburger JJ. Is observation really appropriate for small choroidal melanomas? *Trans Am Ophthalmol Soc* 1993;91:147-168.
- Barr CC, McLean IW, Zimmerman LE. Uveal melanoma in children and adolescents. *Arch Ophthalmol* 1981;99:2133-2136.
- Barry MA, Reynolds JE, Eastman A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* 1993;53:2349-2357.
- Bechrakis NE, Sehu KW, Lee WR, Damato BE, Foerster MH. Transformation of cell type in uveal melanomas: a quantitative histologic analysis. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1406-1412.
- Bechrakis NE, Bornfeld N, Zoller I, Foerster MH. Iodine 125 plaque brachytherapy versus transscleral tumor resection in the treatment of large uveal melanomas. *Ophthalmology* 2002;109:1855-186.
- Benhattar J, Cerottini JP, Saraga E. P53 mutations as a possible predictor of response to chemotherapy in metastatic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1996;69:190-192.
- Bemstein LR, Liotta LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 1994;6:106-113.
- Bergman L, Seregard S, Nilsson B, Ringborg U, Lundell G, Ragnarsson-Olding B. Incidence of uveal melanoma in Sweden from 1960 to 1998. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2579-2583
- Berg R, Hendrix MJ. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:233-246.
- Bertran JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2001;121:167.
- Berube KA, Quinlan TR, Fung H. Apoptosis is observed in mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:141-147.
- Bicknell R, Harris AL. Mechanisms and therapeutic implications of angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 1996;8:60-65.
- Binet JL, Mentz F, Merle Beral H. Apoptosis in blood diseases. Review new data. *Hematol Cell Ther* 1996;38:253-264.
- Bissonnette RP, Echeverri F, Maboubi A. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992;359:552-554.
- Blom DJ, Moy CM, Luyten GP. Inverse correlation between expression HLA-B and c-myc in uveal melanoma. *J Pathol* 1997;181:75-79.
- Boag JW. Maximum likelihood estimates of the proportion of patients cured by cancer therapy. *J Royal Statist Soc (B)* 1949;11:15.

- Boise LH, González-García M, Postems CE. Bcl-x A bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
- Bomanji J, Hungerford JL, Granowska M, Britton KE. Radioimmunoscintigraphy of ocular melanoma with ^{99m}Tc labelled cutaneous melanoma antibody fragments. *British J Ophthalmol* 1987;71:651-658.
- Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics, 1991. *Cancer* 1991;41:19-36.
- Bosman FT, Visser BC, van Oerveren J. Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996;192:676-683.
- Boyd SR, Tan D, Bunce C, Gittos A, Neale MH, Hungerford JL, Charnock-Jones S, Cree IA. Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. *Br J Ophthalmol* 2002;86:448-452.
- Brattain MG, Howell G, Sun LZ. Growth factor balance and tumor progression. *Curr Opin Oncol* 1994;6:77-81.
- Brattain MG, Markowitz SD, Wilson JKV. The type II transforming growth factor- receptor as a tumor-suppressor gene. *Curr Opin Oncol* 1996;8:49-53.
- Bumier MN Jr, McLean IW, Garnel JW. Immunohistochemical evaluation of uveal melanocytic tumors. Expression of HMB-45, S-100 protein, and neuron-specific enolase. *Cancer* 1991;68:809-814.
- Byrne SS, Green RL. *Ultrasound of Eye and Orbits*. St Louis: Mosby Year Book; 1992:50-51.
- Callender GR. Malignant melanotic tumors of the eye: A study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1931;36:131-142.
- Callender GR, Wilder HC, Ash JE. Five hundred melanomas of the choroid and ciliar body followed five years or longer. *Am J Ophthalmol* 1942;25:562-567.
- Canning CR, Hungerford J. Familial uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1988;72:241-243.
- Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992;258:1148-1152.
- Capeans C. Melanomas de la uvea. Comunicación Solicitada. LXIX Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología (SEO), Madrid;1993.
- Cerroni L, Soyer P, Kerl H. Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1995;17:7-11.
- Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions: the B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978;114:732-738.
- Clark Jr, Benjamin H, Gill S. Fusion of the EWS gene to CHN, a member of the steroid/thyroid receptor gene superfamily, in a human myxoid chondrosarcoma. *Oncogene* 1996;2:229-236.
- Coleman DJ, Silverman RH, Roundeou MJ. Correlations of acoustic tissue typing of malignant melanoma and histopathologic features as a predictor of death. *Am J Ophthalmol* 1990;110:380-388.
- Coleman DJ. Three-dimensional acoustic tissue staining of uveal melanoma for monitoring of treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:980.
- Coleman K, Baak JP, Dorman A, Mullaney J, Curran B, Tiernan D, Farrell M, Fenton M, Leader M. Deoxyribonucleic acid ploidy studies in choroidal melanomas. *Am J Ophthalmol* 1993;115:376-383.

- Coleman DJ. Diagnostic and therapeutic. Ultrasound Applications in malignant melanoma. Symposium: Vitreoretinal interfaces. San Francisco;1994.
- Colombel M, Symmans F, Gil S. Detection of the apoptosis suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993;143:390-400.
- Condorelli GL, Facchiano F, Valtieri M. T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice. *Cancer Res* 1996;56:5113-5119.
- Connolly BP, Regillo CD, Eagle RC Jr, Shields CL, Shields JA, Moran H. The histopathologic effects of transpupillary thermotherapy in human eyes. *Ophthalmology* 2003;110:415-20
- Conway RM, Cursiefen C, Behrens J, Naumann GO, Holbach LM. Biomolecular markers malignancy in human uveal melanoma: the role of the cadherin-catenin complex and gene expression profile. *Ophthalmologica* 2003;217:68-75.
- Cottam DW, Rees RC, Parsons MA. Degradative enzyme expression in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:979.
- Cowan JM, Halban R, Franckle U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:1159-64.
- Cree IA. Cell cycle and melanoma-two different tumours from the same cell type. *J Pathol* 2000;191:112-114.
- Crowson AN, Magro CM, Kadin ME, Mihm MC Jr. Differential expression of the bcl-2 oncogene in human basal cell carcinoma. *Hum Pathol* 1996;27:355-359.
- Croxatto JO, Rufino FC. Intercellular adhesion molecule I (ICAM-I) in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1926.
- Cusumano A, Coleman DJ, Silverman RH, Reinstein DZ, Rondeau MJ, Ursea R, Daly SM, Lloyd HO. Three-dimensional ultrasound imaging. *Clin Appl Ophthalmol* 1998;105:300-306.
- Cutolo M, Sulli A, Barone A. Sex hormones, proto-oncogene expression and apoptosis: their effects on rheumatoid synovial tissue. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:87-94.
- Chang M, Zirnerman LE, McLean IW. The persisting pseudomelanoma problem. *Arch Ophthalmol* 1984;102:726-727.
- Char DH. Immunology of uveitis and ocular tumors. Nueva York: Grune & Stratton, 1978.
- Char DH. The management of small choroidal melanomas. *Surv Ophthalmol* 1978;22:377-386.
- Char DH, Heilbron DC, Juster RP, Stone RD. Choroidal melanoma growth patterns. *Br J Ophthalmol* 1983;67:575-578.
- Char DH, Philips TL. Pre-enucleation irradiation of uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1985;69:177-179.
- Char DH. Clinical ocular oncology. Nueva York: Churchill-Livingstone; 1989.
- Char DH, Castro JR, Kroll SM, Irvine AR, Quivey JM, Stone RD. Five-year follow-up of helium ion therapy for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1990;108:209-214.
- Char DH, Quivey JM, Castro JR, Kroll S, Phillips T. Helium ions versus Iodine 125 brachytherapy in the management of uveal melanoma: a prospective randomized, dynamically balanced trial. *Ophthalmology* 1993;100:1547-1554.

- Char DH. Uveal melanoma therapy: charged particles (He ions/protons) vs. I-125 brachitherapy. Symposium: Vitreoretinal Interfaces. San Francisco; 1994.
- Chan J, Flannery JG, LaVail MM. Bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1996;93:7042-7047.
- Chen J, Grant SH, Nakayama M. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:2-10.
- Cheng GH, Levine B, Boise LH. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 1996;554-556.
- Chinnaiyan AM, Orth K, Orouke K. Molecular ordering of the cell death pathway-Bcl-2 and Bcl-XL function upstream of the CED-e-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1996;271:4573-4576.
- Chiquet C, Grange JD, Ayzac L, Chauvel P, Patricot LM, Devouassoux-Shisheboran M. Effects of proton beam irradiation on uveal melanomas: A comparative study of Ki-67 expression in irradiated versus non-irradiated melanomas. *Br J Ophthalmol* 2000;84:98-102.
- Chowers I, Folberg R, Livni N, Peér J. Comparison of microcirculation pattern and MIB-1 immunoreactivity in iris and posterior uveal melanoma. *Ophthalmologica* 2001;108(2):367-371.
- Chowers I, Folberg R, Livni N, Peér J. p53 immunoreactivity, Ki-67 expression, and microcirculation pattern in melanoma of the iris, ciliary body and choroid. *Curr Eye Res* 2002;24:105-108.
- Chowers I, Amer R, Peér J. The correlation among different immunostaining evaluation method for the assessment of the proliferative activity in uveal melanoma. *Curr Eye Res* 2002;25:369-372.
- Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3113-3117.
- Davidorf FH. The melanoma controversy. A comparison of choroidal, cutaneous and iris melanomas. *Surv Ophthalmol* 1981;25:373-377.
- Davidorf FH, Letson AD, Weiss ET, Levine E. Incidence of misdiagnosed and unsuspected choroidal melanomas: a 50-year experience. *Arch Ophthalmol* 1983;101: 410-412.
- De la Cruz PO Jr, Specht CS, McLean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 90;65:112-115.
- De la Paz MA, Yandell DW, Berrocal AM. Search for mutations in the p53 gene in choroidal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO Suppl)* 1992;33:978.
- Demirci H, Shields CL, Shields JA, Eagle RC Jr, Honavar SG. Diffuse iris melanoma: A report of 25 cases. *Ophthalmology* 2002;109:1553-1560.
- Demirci H, Shields CL, Shields JA, Honavar SG, Eagle RC Jr. Ring melanoma of the ciliary body: report on twenty-three patients. *Retina* 2002;22:698-706.
- Desborats L. Myc: A single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells. *Experientia* 1996;52:1672.
- De Potter P, Jamart J. Adjuvant indocyanine green in transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma. *Ophthalmology* 2003;110:406-413.
- De Vries TJ, Mooy CM, Van Balken MR, Luyten GP, Quax PH, Verspaget HW, Weidle UH, Ruiters DJ, Van Muijen GN. Components of the plasminogen activation system in uveal melanoma. A clinicopathological study. *J Pathol* 1995;175:59-67.

- De Wit PE, Van Muijen GN, De Waal RM, Ruiter DJ. Pathology of malignant melanoma, including new markers and techniques in diagnosis and prognosis. *Curr Opin Oncol* 1996;8:143-151.
- Diener-West M, Hawkins BS, Markowitz JA, Schachat AP. A review of mortality from choroidal melanoma. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* 1992;110:145-250.
- Dithmar S, Crowder J, Jager MJ, Vigniswaran N, Grossniklaus HE. HLA class I antigen expression correlates with histological cell type in uveal melanoma. *Ophthalmologe* 2002;99:625-628.
- Doepner D, Rocholl J, Bengisu M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nucleolar organizer regions (NORs) in choroidal melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1926.
- Dolnikov A, Ward RL, Hawkins NJ. Apoptosis in v-myc transformation of myelomonocytic cells and its modulation by CSF-1. *Oncogene* 1996;12:1189-1198.
- Donoso LA, Berd D, Augsburger JJ, Mastrangelo MJ, Shields JA. Metastatic uveal melanoma. Pretherapy serum liver enzyme and liver scans abnormalities. *Arch Ophthalmol* 1985;103:796.
- Donoso LA, Folberg R, Edelberg K, Arbizo V, Atkinson B, Herlyn M. Tissue distribution and biochemical properties of an ocular melanoma-associated antigen. *J Histochem Cytochem* 1985;33:1190-1196.
- Donoso LA, Shields JA, Augsburger JJ, Orth DH, Johnson P. Metastatic uveal melanoma: diffuse hepatic metastasis in a patient with concurrent normal serum enzymes and liver scan. *Arch Ophthalmol* 1985;103:799.
- Donoso LA, Folberg R, Naidu R, Augsburger JJ, Shields JA, Atkinson B. Metastatic uveal melanoma. Hepatic metastases identified by 8 hybridoma-secreted monoclonal antibody Mab8-11. *Arch Ophthalmol* 1985;103:799-801.
- Donoso LA, Shields JA, Augsburger JJ, Whitman J, Arbizo V. Antigenic and cellular heterogeneity in primary uveal malignant melanomas. *Arch Ophthalmol* 1986;104:106-110.
- Donoso LA, Felberg NT, Edelberg K, Borlinghaus P, Herlyn M. Metastatic uveal melanoma: An ocular melanoma associated antigen in the serum of patients with metastatic disease. *J Immunoassay* 1986;7:273.
- Dowell SP, Wilson POG, Derias NW. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 1994;54:2914-2918.
- Dracopoli MC, Houghton AN, Old LJ. Loss of polymorphic restriction fragments in malignant melanoma: implications for tumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1470-1474.
- Dracopoli NC, Harnett P, Bale SJ, Stanger BZ, Tucker MA, Housman DE, Kefford RF. Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4614-4618.
- Durie FH, Campbell AM, Lee WR. Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2106-2110.
- Durie FH, George WD, Campbell AM, Damato BE. Analysis of clonality of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer and uveal melanoma. *Immunol Lett* 1992;33:263-269.
- Eagle RC Jr. Immunohistochemical diagnosis of intraocular lesions. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:211-222.
- Earle JD, Kline RW, Robertson DM. Selection of iodine-125 for the Collaborative Ocular Melanoma Study. *Arch Ophthalmol* 1987;105:763-764.

- Edward M. Integrins and other adhesion molecules involved in melanocytic tumor progression. *Curr Opin Oncol* 1995;7:185-191.
- Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Gragoudas ES, Albert DM. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1988;32:239-251.
- Egan KM, Walsh SM, Seddon JM, Gragoudas ES. An evaluation of reproductive factors on the risk of metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993;100:1160-1166.
- Eichhorst ST, Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. *Lancet* 2001;358:345.
- Eide N, Syrdalen P, Scheie D, Chen Y, Elgjo K, Kerty E, Brabrand K. Uveal melanomas with optic nerve extension: Report of two cases diagnosed by transvitreal biopsy, one of them with a multicentric tumour. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:322-325.
- El-Deiry WS. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. *Curr Opin Oncol* 1997;9:79-87.
- Ericsson C, Seregard S, Bartolazzi A, Levitskaya E, Ferrone S, Kiessling R, Larsson O. Association of HLA class I and class II antigen expression and mortality in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2153-2156.
- Eskelin S, Pyrhonen S, Summanen P. Screening for metastatic malignant melanoma of the uvea revisited. *Cancer* 1999;85:1151-1159.
- Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992;359:554-556.
- Ferry AP. Lesions mistaken for malignant melanoma of the posterior uvea: A clinicopathologic analysis of 100 cases with ophthalmoscopically visible lesions. *Arch Ophthalmol* 1964;72:463-469.
- Ferry AP. Lesions mistaken for malignant melanoma of the iris. *Arch Ophthalmol* 1965;74:9-18.
- Ferry AP. Hemangiomas of the iris and ciliary body. Do they exist? A search for a histologically proved case. *Int Ophthalmol Clin* 1972;12:177-194.
- Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978;28:14.
- Fine SL. Do I take the eye out or leave it in? *Arch Ophthalmol* 1987;105:763-764.
- Finger PT. Microwave thermoradiotherapy for uveal melanoma. Results of a 10-year study. *Ophthalmology* 1997;104:1794-1803.
- Flocks M, Gerende JH, Zimmerman LE. The size and shape of malignant melanomas of the choroid and ciliary body in relation to prognosis and histologic characteristics. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1955;59:740-756.
- Folberg R, Donoso LA, Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, Arbizu VV. The application of anti-melanoma monoclonal antibody ME491 to the histopathology of uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1985;103:275-279.
- Folberg R, Augsburger JJ, Gamel JW, Shields JA, Lang WR. Fine-needle aspirates of uveal melanomas and prognosis. *Am J Ophthalmol* 1985;100:654-657.
- Folberg R, Pe'er J, Gruman LM, Woolson RF, Jeng G, Montague PR, Moninger TO, Yi H, Moore KC. The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: A matched case-control study. *Hum Pathol* 1992;23:1298-1305.

- Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, Hwang T, Woolson RF, Pe'er J, Gruman LM. The prognostic value of tumor blood vessels morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993;100:1389-1398.
- Font RL, Spaulding AG, Zimmerman LE. Diffuse malignant melanoma of the uveal tract. A clinicopathologic report of 54 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1968;72:877-894.
- Forloni G, Bugiani O, Tagliavini F. Apoptosis-mediated neurotoxicity induced by beta-amyloid and PrP fragments. *Mol Chem Neuropathol* 1996;28:163-171.
- Foulds WS. Management of intraocular melanoma. *Br J Ophthalmol* 1990;74:559-560.
- Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, Lahti J. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:557-561.
- Gallagher RP, Elwood JM, Rootman J, Spinelli JJ, Hill GB, Threlfall WJ, Birdsell JM. Risk factors for ocular melanoma: The Western Canada Melanoma Study. *J Nat Cancer Inst* 1985;74:775-778.
- Gallagher RP, Elwood JM, Rootman J, Threlfall WJ, Davis J. Symptoms and time to presentation and treatment in ocular melanoma: The Western Canada Melanoma Study. *Can J Ophthalmol* 1988;23:11-13.
- Gamel JW, McLean IW. Quantitative analysis of Callender's classification of uveal melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:686-691.
- Gamel JW, McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanomas: correlation of cytologic features with prognosis. *Cancer* 1978;41:1897-1901.
- Gamel JW, McLean IW, Greenberg RA, Zimmerman LE, Lichtenstein SJ. Computerized histologic assessment of malignant potential: A method for determining the prognosis of uveal melanomas. *Hum Pathol* 1982;13:893-897.
- Gamel JW, McLean IW. Computerized histopathologic assessment of malignant potential. II. A practical method for predicting survival following enucleation for uveal melanoma. *Cancer* 1983;1032-1038.
- Gamel JW, McLean IW. Modern developments in histopathologic assessment of uveal melanomas. *Ophthalmology* 1983;91:6684-6789.
- Gamel JW. Ocular melanoma. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1284.
- Gamel JW, McCurdy, McLean IW. A comparison of prognostic covariates for uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1919-22.
- Gamel JW, McLean IW, McCurdy JB. Biologic distinctions between cure and time to death in 2892 patients with intraocular melanoma. *Cancer* 1993;71:2299.
- Ganley JP, Comstock GW. Bening nevi and malignant melanoma of the choroid. *Am J Ophthalmol* 1973;76:19-25.
- Gass JD. Problems in the differential diagnosis of choroidal nevi and malignant melanomas. The XXXIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1977;83:299-323.
- Gass JDM. Observation of suspected choroidal and ciliary melanomas for evidence of growth prior to enucleation. *Ophthalmology* 1980;80:523-528.
- Gauthier ER, Piche L, Lemieux G. Role of bcl-XL in the control of apoptosis in murine myeloma cells. *Cancer Res* 1996;56:1451-1456.

- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *In Situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
- Geisse LJ, Robertson DM. Iris melanomas. *Am J Ophthalmol* 1985;99:638-648.
- Gherardi G, Scherini P, Ambrosi S. Occult thyroid metastasis from untreated uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1985;103:68.
- Gonder JR, Shields JA, Albert DM, Augsburger JJ, Lavin PT. Uveal malignant melanoma associated with ocular and oculodermal melanocytosis. *Ophthalmology* 1982;89:953-960.
- Gorczyca W, Gong JP, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strands breaks in individual apoptotic cells by the *In Situ* Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation assay. *Cancer Res* 1993;53:1945-1951.
- Gragoudas ES, Seddon JM, Egan K, Glynn R, Munzenrider J, Austin-Seymour M, Goitein M, Verhey L, Urie M, Koehler A. Long-term results of proton beam irradiated uveal melanomas. *Ophthalmology* 1987;94:349-353.
- Gragoudas ES, Seddon JM, Egan KM, Glynn RJ, Goitein M, Munzenrider J, Verhey L, Urie M, Koehler A. Metastasis from uveal melanoma after proton beam irradiation. *Ophthalmology* 1988;95:992-999.
- Gragoudas ES, Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Walsh SM, Finn SM, Munzenrider JE, Spar MD. Survival of patients with metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology* 1991;98:383-390.
- Gragoudas ES. Current approaches in the management of uveal melanomas. *Int Ophthalmol Clin* 1992;32:129-138.
- Gragoudas ES. The biology of choroidal melanoma and the decision of when to treat. Symposium: Vitreoretinal Interfaces. San Francisco; 1994.
- Gragoudas E, Li W, Goitein M, Lane AM, Munzenrider JE, Egan KM. Evidence-based estimates of outcome in patients irradiated for intraocular melanoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1665-1671
- Green DR, McGahon A, Martin SJ. Regulation of apoptosis by oncogenes. *J Cell Biochem* 1996;60:33-38.
- Green WR. The uveal tract. In: Spencer WH, Font RL, Green WR. *Ophthalmic pathology: An atlas and text book*. Philadelphia: W.B. Saunders:1522-1542.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-4878.
- Greene MH, Fraumeni JF Jr. The hereditary variant of malignant melanoma. En: Clark WH Jr., Goldman LI, Mastrangelo MJ (eds.) *Human malignant melanoma*. Nueva York: Grune and Stratton, 1979:139-166.
- Grossniklaus HE. Fine needle aspiration biopsy of the iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO Suppl)* 1992;33:978.
- Grover R, Wilson GD. Bcl-2 expression in malignant melanoma and its prognostic significance. *Europ J Surg Oncol* 1996;22:347-349.
- Gunduz K, Shields JA, Shields CL, Eagle RC Jr. Cutaneous melanoma metastatic to the vitreous cavity. *Ophthalmology* 1998;105:600-605.
- Gunduz K, Shields JA, Shields CL. Plaque radiotherapy of melanoma predominant ciliary body involvement. *Arch Ophthalmol* 1999;117:170-177.

- Guyer DR, Mukai S, Egan KM, Seddon JM, Walsh SM, Gragoudas ES.. Radiation maculopathy after proton beam irradiation for choroidal melanoma. *Ophthalmology* 1992;99:1278-1285.
- Haffner R, Oren M. Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Develop* 1995;5:84-90.
- Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: A receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol* 1995;7:76-82.
- Hainsworth DP, Todd KC, Ranson NT, Gigantelli JW. Retinal vascular alterations associated with dome-shaped and mushroom-shaped choroidal melanomas. *Int Ophthalmol* 2001;24:141-146
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57.
- Harbour JW, Char DH, Kroll S, Quivey JM, Castro J. Metastatic risk for distinct patterns of postirradiation local recurrence of posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 1997; 104:1785-1793.
- Harris CC, Hollstein M: Clinical implication of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318.
- Hayton S, Lafreniere R, Jerry LM, Temple WJ, Ashley P. Ocular melanoma in Alberta: A 38-year review pointing to the importance of tumor size and tumor histology as predictors of survival. *J Surg Oncol* 1989;42:215.
- Hayward NK. The current situation with regard to human melanoma and genetic inferences. *Curr Opin Oncol* 1996;8:136-142.
- Herlyn M, Albino A, Bergman W, Dracopoli N, Ellem KO, Hayward N, Hersey P, MacLennan R. Molecular genetics, immunology and experimental pathology of melanoma. *International Melanoma Conference. Melanoma Res.* 1994;4:331-336.
- Hinds PW. The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Develop* 1995;5:79-83.
- Hockenbery D, Nuñez G, Milliran C. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1991;348:334-336.
- Hockenbery D, Zutte M, Hickey W. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965.
- Horsman DE, White VA. Cytogenic analysis of uveal melanoma: consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q. *Cancer* 1993; 71:811-819.
- Huang PS, Heimbrook DC. Oncogene products as therapeutic targets for cancer. *Curr Opin Oncol* 1997;9:94-100.
- Huerta C, Rodriguez LA. Incidence of ocular melanoma in the general population and in glaucoma patients. *J Epidemiol Community Health* 2001;55:338-339
- Hurliman J, Larrinaga B, Vala DC. Bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch* 1995;426:163-168.
- Isaacs JT. Advances and controversies in the study of programmed cell death/apoptosis in the development of and therapy for cancer. *Curr Opin Oncol* 1994;6:82-89.
- Jager MJ, de Wollf-Rouendaal D, Breebaart AC. Expression of HLA antigens in paraffin sections of uveal melanomas. *Doc Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1451-1458.
- Jakobiec F A, Silbert G. Are most iris "melanomas" really nevi? A clinicopathologic study of 189 lesions. *Arch Ophthalmol* 1981;99:2117-2132.

- Jampol LM, Moy CS, Murray TG, Reynolds SM, Albert DM, Schachat AP, Diddie KR, Engstrom RE Jr, Finger PT, Hovland KR, Joffe L, Olsen KR, Wells CG. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: IV. Local treatment failure and enucleation in the first 5 years after brachytherapy. COMS report no. 19. *Ophthalmology* 2002;109:2197-2206.
- Janssen K, Kuntze J, Busse H, Schmid KW. P53 oncoprotein overexpression in choroidal melanoma. *Mod Pathol* 1996;9:267-272.
- Jay V, Yi Q, Hunter WS, Zielenska M. Expression of bcl-2 in uveal malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:497-498.
- Jensen OA. Malignant melanomas of the uvea in Denmark 1943-1952: A clinical, histopathological and prognostic study. *Acta Ophthalmol (Suppl)* 1963;75:17-78.
- Jensen OA. Malignant melanomas of the human uvea: Recent follow-up of cases in Denmark, 1943-1952. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1970;48:1113.
- Jensen OA. Malignant melanomas of the human uvea: 25 year follow-up of cases in Denmark, 1943-1952. *Acta Ophthalmol* 1982;60:161-182.
- Johnson MW, Skuta GL, Kincaid MC, Nelson CC, Wolter JR. Malignant melanoma of the iris in xeroderma pigmentosum. *Arch Ophthalmol* 1989;107:402-407.
- Jones CLA, Kane MA. Oncogenic signaling. *Curr Opin Oncol* 1996;8:54-59.
- Journee-de Korver JG, Keunen JE. Thermotherapy in the management of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:303-317.
- Kanda S, Cochran AJ, Lee WR, Morton DL, Irie RF. Variations in the ganglioside profile of uveal melanoma correlate with cytologic heterogeneity. *Int J Cancer* 1992;52:682.
- Kan-Mitchell J, Rao N, Albert DM, Van Eldik LJ, Taylor CR. S100 immunophenotypes of uveal melanoma. *Invest Oph Vis Sci* 1990;31:1492-1496.
- Kerr JFR, Winterford CCM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. 1994;73:2013-2026.
- Kincaid MC, Grossniklaus HE. Immunohistochemical staining in ophthalmic pathology. *Ophthalmol Clin N Am* 1995;8:17-24.
- Kincaid MC. Uveal Melanoma. *Cancer Control* 1998;5:299-309.
- Kingma DW, Weiss WB, Jaffe ES. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas. *Blood* 1996;88:242-251.
- Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 1971; 68:820-823.
- Korsmeyer SJ. Bcl-2: An antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992;15:105-1118.
- Koskinen PJ, Alitalo K. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation, and death. *Semin. Cancer Biol.* 1993; 4:3.
- Kraehn GM, Scharf M, Peter RU. Human malignant melanoma. A genetic disease?. *Cancer* 1995;7:1228-1237.
- Kroll SM, Char DH, Kaleta-Michaels S. Length of uveal melanoma DNA synthesis phase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:980.

- Kroll SM, Char DH, Quivey J, et al. A comparison of cause-specific melanoma mortality and all-cause mortality in survival analyses after radiation treatment for uveal melanoma. *Ophthalmology* 1998;105:2035-2045.
- Kroumpouzou G, Eberle J, Garbe C, Orfanos CE. P53 mutation and c-fos overexpression are associated with detection of the antigen VLA-2 in human melanoma cell lines. *Pigment Cell Res* 1994;7:348-353.
- Kumar, Cotran, Robbins. Neoplasias (Carcinogenesis: Bases Moleculares del cáncer). En: *Patología Humana de Robbins (7ª edición en español)*. Madrid: Elsevier España SA, 2003.
- Kuo PK, Puliafito CA, Wang KM, Liu HS, Wu BF. Uveal melanoma in China. *Int Ophthalmol Clin* 1982;22:57-71.
- Lane DP. The regulation of p53 function. Steinert award lecture. *Int J Cancer* 1994;57:623-627.
- Langmann G, Kleinert R, Wirnsberger GH, Faulborn J, Faschinger C. Proliferation markers, enzyme markers and oncogene expression profile of intraocular melanoma. *Ophthalmologie* 1993;90:528-532.
- Lassam NJ, From L, Khan HJ. Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Res* 1993;53:2235-2238.
- Laurent-Crawford AG, Krust B, Riviere I. Membrane expression of HIV envelop glycoprotein apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:761-773.
- Le Brun DP, Warkne RA, Cleary MI. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993;142:743-753.
- Leone G. myc and ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin e/cdk2 and e2f. *Nature* 1997; 387:422.
- Levine AJ, Momand J, Finley CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-451.
- Levine AJ, Broach JR. Editorial overview. *Curr Opin Genet Develop* 1995;5:1-4.
- Li W, Judge H, Gragoudas ES, Seddon JM, Egan KM. Patterns of tumor initiation in choroidal melanoma. *Cancer Res* 2000;60:3757-3760.
- Li W, Gragoudas ES, Egan KM. Tumor basal area and metastatic death after proton beam irradiation for choroidal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2003;121:68-72.
- Lieb WE, Shields JA, Cohen SM, Merton DA, Mitchell DG, Shields CL, Goldberg BB. Color Doppler imaging in the management of intraocular tumors. *Ophthalmology* 1990;97:1660-1664.
- Lieberman DA. Molecular biology of normal development, malignancy and its suppression. *Oncogene* 1996;12:2247-2250.
- Linstadt D, Castro J, Char D, Decker M, Ahn D, Petti P, Nowakowski V, Quivey J, Phillips TL. Long-term results of helium ion irradiation of uveal melanoma. *Inter J Radiol Oncol, Biol, Phys* 1990;19:613-618.
- Lommatzsch PK. Results after B-irradiation (106 Ru/106Rh) of choroidal melanomas: 20 years' experience. *Br J Ophthalmol* 1986;70:844-851.
- Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1991;157:1279-1281.
- Lotem J, Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* 1996;10:925-931.

- Lu C, Kerbel RS. Cytokines, growth factors and the loss of negative growth controls in the progression of human cutaneous malignant melanoma. *Curr Opin Oncol* 1994;6:212-220.
- Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2 role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996;27:102-110.
- Lui Y, *Carcinogenesis* 2001;22::851.
- Lupulescu AP. Hormones, vitamins, and growth factors in cancer treatment and prevention. A critical appraisal. *Cancer* 1996;78:2264-2280.
- MacKie RM. Melanoma and other skin neoplasm. Editorial overview. *Curr Opin Oncol* 1996;8:133-135.
- Manschot WA. Ring melanoma. *Arch Ophthalmol* 1964;71:625-632.
- Manschot WA, Van Strik R. Is radiation a justifiable treatment of choroidal melanoma? Analysis of published results. *Br J Ophthalmol* 1987;71:348-352.
- Manschot W A, van Strik R. Uveal melanoma: therapeutic consequences of doubling times and irradiation results; a review. *Int Ophthalmol* 1992;16:91-99.
- Margo CE, McLean IW. Malignant melanoma of the choroid and ciliary body in black patients. *Arch Ophthalmol* 1984;103:77-79.
- Markowitz JA, Hawkins BS, Diener-West M, Schachat AP. A review of mortality from choroidal melanoma. Quality of published reports, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* 1992;110:239-244.
- Marshall JF, Rutherford DC, McCartney AC, Mitjans F, Goodman SL, Hart IR. Alfa v beta 1 is a receptor for vitronectin and fibrinogen, and acts with alfa-5 beta-1 to mediate spreading on fibronectin. *J Cell Sci* 1995;108:1227-1238.
- Marcus DM, Minkovitz JB, Wardwell SD. The value of nucleolar organizer regions in uveal melanoma. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1990;110:527-534.
- Massagué J, Polyak K. Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opin Genet Develop* 1995;5:91-96.
- McCartney ACE, Marshall JF, Hart IR. Differential integrin expression and its role in the metastasis of ocular and cutaneous melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:979.
- Mc Cormick D, Yu C, Hobbs C. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology*, 1993;22:543-547.
- McCurdy J, Gamel J, McLean IW. A simple, efficient and reproducible method for estimating the malignant potential of uveal melanoma from routine H & E slides. *Pathol Res Pract* 1991;187:1025.
- McGregor JM, Yu CC, Dublin EA, Barnes DM, Levison DA, MacDonald DM. P53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. *Br J Dermatol* 1993;128:606-611.
- McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of the choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977;95:48-58.
- McLean IW, Zimmerman LE, Evans RE. Reappraisal of Callender's spindle A type of malignant melanoma of choroid and ciliary body. *Am J Ophthalmol* 1978;86:557-564.
- McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Martin DG. Inferred natural history of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol* 1980;19:760-770.

- McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanoma: Location, size, cell type, an enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* 1982;13:123.
- McLean IW, Foster WE, Zimmerman LE. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* 1983;96:502-509.
- McLean IW, Gamel JW. Prediction of metastasis of uveal melanoma: Comparison of morphometric determination of nuclear size and spectrophotometric determination of DNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:507-511.
- McLean IW. The biology of haematogenous metastasis in human uveal malignant melanoma. *Virchow's Arch A Pathol Res Pract* 1991;187:1025.
- McLean IW. Prognostic features of uveal malignant melanoma. *Ophthalmol Clin N Am* 1995;8:143-153.
- McLean IW, Keefe KS, Bumier MN. Uveal Melanoma. Comparison of the prognostic value of fibrovascular loops, mean of the ten largest nucleoli, cell type, and tumor size. *Ophthalmology* 1997;104:777-780.
- Meecham WJ, Char DN. DNA content abnormalities and prognosis in uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1986;104:1626-1629.
- Melia BM, Abramson DH, Albert DM, Boldt HC, Earle JD, Hanson WF, Montague P, Moy CS, Schachat AP, Simpson ER, Straatsma BR, Vine AK, Weingeist TA; Collaborative brachytherapy for medium choroidal melanoma. I. Visual acuity after 3 years COMS report no. 16. *Ophthalmology* 2001;108:348-366.
- Memmen JE, McLean IW. The long-term outcome of patients undergoing iridocyclectomy. *Ophthalmology* 1990;97:429-432.
- Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995.
- Meyn RE, Stephens LC, Milas L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev* 1996;5:119-131.
- Mieler WF. The place for primary enucleation and irradiation. Symposium: Vitreoretinal Interfaces. San Francisco; 1994.
- Miller B, Abrahams C, Cole GC, Proctor NS. Ocular malignant melanoma in south african blacks. *Br J Ophthalmol* 1981;65:720-722.
- Mims JL III, Shields JA. Follow-up studies of suspicious choroidal nevi. *Ophthalmology* 1978;85:929-943.
- Mittica N, Vemuganti GK, Duffy M, Torczynski E, Edward DP. Late orbital recurrence of a choroidal melanoma following internal resection: Report of a case and review of the literature. *Surv Ophthalmol* 2003;48:181-90
- Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 gene transfer increase relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992;52:5407-5411.
- Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-157.
- Mooy CM, de Jong PT, Van der Kwast TH, Mulder PG, Jager MJ, Ruiter DJ. Ki-67 immunostaining in uveal melanoma. *Ophthalmology* 1990;97:1275-1280.

- Mooy CM, de Jong PTVM. Prognostic parameters in uveal melanoma: A review. *Surv Ophthalmol* 1996;41:215-228.
- Mork T. Malignant neoplasms of the eye in Norway: Incidence, treatment and prognosis. *Acta Ophthalmologica* 1961;39:824-831.
- Mosnier JF, Perret AG, Vindimian M. An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumors of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:654-659.
- Mukai S, Dryja TP. Loss of alleles at polymorphic loci on chromosome 2 in uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;22:45-53.
- Muñoz A. Control de la proliferación celular. En: *Cáncer: Genes y nuevas terapias*. Madrid: Hélice 1997;4:74.
- Murray AW, Hunt T. *The cell cycle, an introduction*. Nueva York: Freeman, 1993.
- Nakamura S, Azakawa K, Kinukawa N. Inverse correlation between the expression of bcl-2 and p53 proteins in primary gastric lymphoma. *Hum Pathol* 1996;27:225-233.
- Natali PG, Nicotra MR, Digiesi G, Cavaliere R, Bigotti A, Trizio D, Segatto O. Expression of gp185 HER-2 in human cutaneous melanoma: Implications for experimental immunotherapeutics. *Int J Cancer* 1994;56:341-346.
- National Institutes of Health Guide for grants and contracts. Protocol of the Collaborative Ocular Melanoma Study. 1986;15:11.
- Naumann GO. Uvea. In: Naumann GO, Apple DJ. *Pathology of the Eye*. Nueva York:1986:459-468.
- Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Mol Genet* 2001;10:699.
- Niederhorn N. Eucleation-induced metastasis of intraocular melanoma in mice. *Ophthalmology* 1984;91:692-700.
- Niederhorn N. T cell subsets involved in the rejection of metastases arising from intraocular melanomas in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1397-1403.
- Nurse P. Universal control mechanism in regulating onset of m-phase. *Nature* 1990;344:503-508.
- Ofner D, Reinhemann K, Maier H Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: Correlation with tumor stage and patient survival. *Br J Cancer* 1995;19:1418-1422.
- Ohta M, Nagai H, Shimizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM. Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK4, in melanoma. *Cancer Res* 1994;54:5269-5272.
- Olah E, Csokay B, Prajda N. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer Res* 1996;16:2469-2477.
- Oosterhuis JA, Went LN, Lynch HT. Primary choroidal and cutaneous melanomas, bilateral choroidal melanomas, and familial occurrence of melanomas. *Br J Ophthalmol* 1982;66:230-233.
- Oosterhuis J, Journee-de Korver HG; Kakebeeke-kemme HM. Transpupillary thermotherapy in choroidal melanomas. *Arch Ophthalmol* 1995;113:315-321.
- Packer S, Stoller S, Lesser ML, Mandel FS, Finger PT. Long-term results of iodine 125 irradiation of uveal melanoma. *Ophthalmology* 1992;99:767-774.

- Panagopoulos JA, Svitra PP, Puliafito CA, Gragoudas ES. Photodynamic therapy for experimental intraocular melanoma using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine. *Arch Ophthalmol* 1989;107:886-890.
- Parenti AR, Rugge M, Frizzera E. P53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1418-1422.
- Paul EV, Parnell BL, Fraker M. Prognosis of malignant melanomas of the choroid and ciliary body. *Int Ophthalmol Clin* 1962;2:387-402.
- Peitsch MC, Polzar B, Stephan H. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993;12:371-377.
- Peyman GA, Juarez CP, Diamond JG. Ten years experience with eye wall resection for uveal malignant melanoma. *Ophthalmology* 1984;91:1720-1725.
- Pezzella F, Turkey H, Kuzu I. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993;329:690-694.
- Pierard GE, Pierard-Franchimont C. The proliferative activity of cells of malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 1984;6:317-323.
- Pilotti S, Collini P, Rilke F. Bcl-2 protein expression in carcinomas originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *J Pathol* 1994;172:337-342.
- Polakis P. More than one way to skin a catenin. *Cell* 2001;105:563.
- Pre'er J, Gnessin H, Shargal Y, Livni N. PC-10 immunostaining of proliferating cell nuclear antigen in posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 1994;101:56-62.
- Prescher G, Bornfeld N, Becher R. Nonrandom chromosomal abnormalities in uveal melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1765-1769.
- Prescher G, Bornfeld N, Horsthemke B, Becher R. Chromosomal aberrations defining uveal melanoma of poor prognosis. *Lancet* 1992;339:691-692.
- Prescher G, Bornfeld N, Hirche H et al. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-1225.
- Rahi AH, Agrawal PK. Prognostic parameters in choroidal melanoma. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1977;97:368-372.
- Raivio I. Uveal melanoma in Finland: An epidemiological, clinical, histological and prognostic study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1977;133:3-64.
- Rajpal S, Moore R, Karakousis CP. Survival in metastatic ocular melanoma. *Cancer* 1983;52:334-336.
- Recsan Z, Karlinger K, Fodor M, Zalatnai A, Papp M, Salacz G. MRI for the evaluation of scleral invasion and extrascleral extension of uveal melanomas. *Clin Radiol* 2002;57:371-376.
- Reed SI. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:529-561.
- Ren ZP, Ponten F, Nister M. Two distinct p53 immunohistochemical patterns in skin cancer, precursors and normal epidermis. *Int J Cancer* 1996;69:174-179.
- Rennie IG, Rees RC, Parsons MA, Lawry J, Cottam D. Estimation of DNA content in uveal melanomas by flow cytometry. *Eye* 1989;3:611-617.

- Ringens PJ, van Haperen R, Vennegoor C, de Jong PT, van Duinen SG, Ruiter DJ, van der Kamp AW. Monoclonal antibodies in detection of choroidal melanoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989;117:287-290.
- Robertson DM, Campbell RJ. Errors in the diagnosis of malignant melanoma. *Ophthalmol* 1979;87:269-275.
- Robertson DM. A rationale for comparing radiation to enucleation in the management of choroidal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1989;108:448-451.
- Rodriguez-Sains RS. Ocular findings in patients with dysplastic nevus syndrome. *Ophthalmology* 1986;93:6661-665.
- Rones B, Zimmerman L. The prognosis of primary tumors of the iris treated by iridectomy. *Arch Ophthalmol* 1958;60:193-205.
- Rowley PT, Keng PC, Kosciolk BA. The effect of bcr-abl antisense oligonucleotide on DNA synthesis and apoptosis in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 1996;20:473-480.
- Royds JA, Sharrard RM, Parsons MA, Lawry J, Rees R, Cottam D, Wagner B, Rennie IG. C-myc oncogene expression in ocular melanomas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;30:366-371.
- Ruley HE. P53 and response to chemotherapy and radiotherapy. *Importance Adv Oncol*;1996:37-56.
- Rummelt V, Folberg R, Woolson RF. Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behaviour of ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 1995;102:844-851.
- Rünger TM, Klein CE, Becker JC. The role of genetic instability, adhesion, cell motility, and immune escape mechanisms in melanoma progression. *Curr Opin Oncol* 1994;6:188-196.
- Saenz-Santamaria MC, Reed JA, McNutt NS, Shea CR. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in melanomas and intradermal nevi. *J Cutan Pathol* 1994;21:393-397.
- Sahel JA, Albert DM. Choroidal nevi. En: *Ryan's diseases and surgery of the retina and vitreous*. San Luis: C.V. Mosby; 1994.
- Sahel JA, Pesavento R, Frederick AR Jr, Albert DM. Melanoma arising de novo over 16 month period. *Arch Ophthalmol* 1988;106:381-386.
- Saornil MA, Egan KM, Gragoudas ES. The time course of irradiation changes in proton beam treated uveal melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:980.
- Sarasols L, García J, Cavero L. Biopsia coriorretiniana asociada a vitrectomía en tumores coroides posteriores. *Actas Soc Esp Retina y Vítreo* 1998:53-55.
- Sarbia M, Bittinger F, Porschen R. Bcl-2 expression in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Path Res Pract* 1996;192:340.
- Sassani JW, Wenstein JM, Graham WP. Massively invasive diffuse choroidal melanoma (clinical conference). *Arch Ophthalmol* 1985;103:945-948.
- Scotto J, Fraumeni JF Jr, Lee JAH. Melanomas of the eye and other noncutaneous sites. Epidemiologic aspects. *J Nat Cancer Inst* 1976;56:489-491.
- Schachat AP. Tumors. En *Ryan SJ: Retina*. San Luis: CV Mosby Co; 1989.
- Schaling DF, Jager MJ, Van Kroonenburg MJP. The clinical status of immunoscintigraphy with monoclonal antibodies in ocular melanoma. *Int J Biological Markers* 1991;6:25-30.

- Scheidler J, Leinsinger G, Kirsch CM, Scheiffarth OF, Stefani FH, Riedel KG. Immunoinaging of choroidal melanoma: Assessment of its diagnostic accuracy and limitations in 101 cases. *Br J Ophthalmol* 1992;76:457-460.
- Schmidt-Erfurth U, Laqua H, Schlotzer-Schrehard U, Viestenz A, Naumann GO. Histopathological changes following photodynamic therapy in human eyes. *Arch Ophthalmol* 2002;120:835-844.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology* 1993;133:591-599.
- Seddon JM, MacLaughlin DT, Albert DM, Gragoudas ES, Ference M 3rd. Uveal melanomas presenting during pregnancy and the investigation of estrogen receptors in melanomas. *Br J Ophthalmol* 1982;66:695-704.
- Seddon JM, Albert DM, Lavin PT, Robinson N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1894-1899.
- Seddon JM, Gragoudas ES, Albert DM, Hsieh CC, Polivogianis L, Friedenbergr GR. Comparison of survival rates for patients with uveal melanoma after treatment with proton beam irradiation or enucleation. *Am J Ophthalmol* 1985;99:282-290.
- Seddon JM, Egan KM, Gragoudas ES. Epidemiology of uveal melanoma. En Ryan SJ: *Retina*. San Luis: C.V. Mosby; 1989:639-646.
- Seddon JM, Gragoudas ES, Egan KM, Glynn RJ, Howard S, Fante RG, Albert DM. Relative survival rates after alternative therapies for uveal melanoma. *Ophthalmology* 1990;97:769-777.
- Seddon JM, Egan K, Gragoudas ES. Uveal melanoma prognosis. En Ryan SJ: *Retina*. San Luis: C.V. Mosby; 1994.
- Seigel D, Myers M, Ferris F 3rd, Steinhorn SC. Survival rates after enucleation of eyes with malignant melanoma. *Am J Ophthalmol* 1979;87:761-765.
- Sela Donenfeld D, Korner M, Pick M. Programmed endothelial cell death induced by an avian hemangioma retrovirus is density dependent. *Virology* 1996;223:233-237.
- Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Peer J, Maniotis AJ, Trent Fol Seregard S, Oskarsson M, Spanberg B. PC-10 immunostaining of proliferating cell nuclear antigen in posterior uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1451-1458.
- Shammas HF, Blodi FC. Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:63-69.
- Shay JW et al.,. Telomerase and cancer. *Hum Pathol Genet* 2001;10:677.
- Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Develop* 1995;5:105-111.
- Sherr CJ. Cancer cell cycle. *Science* 1996;274:1672.
- Shields CL, Shields JA, Shields MB, Augsburger JJ. Prevalence and mechanisms of secondary intraocular pressure elevation in eyes with intraocular tumors. *Ophthalmology* 1987;94:839-846.
- Shields CL, Shields JA, Cater J, Gunduz K, Miyamoto C, Micaily B, Brady LW. Plaque radiotherapy for uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:129-136.
- Shields CL, Shields JA, Cater J. Transpupillar thermotherapy for choroidal melanoma. Tumor control and visual results in 100 consecutive cases. *Ophthalmology* 1998;105:581-590.

- Shields CL, Shields JA, Perez N, Singh AD, Cater J. Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: outcomes and limitations. *Ophthalmology* 2002;109:225-234.
- Shields CL, Cater J, Shields JA, Chao A, Krema H, Materin M, Brady LW. Combined plaque radiotherapy and transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma: Tumor control and treatment complications in 270 consecutive patients. *Arch Ophthalmol* 2002;120:933-940.
- Shields CL, Naseripour M, Cater J, Shields JA, Demirci H, Youseff A, Freire J. Plaque radiotherapy for large posterior uveal melanomas (> or =8-mm thick) in 354 consecutive patients. *Ophthalmology* 2002;109:1838-1849.
- Shields JA, Zimmerman LE. Lesions simulating malignant melanoma of the posterior uvea. *Arch Ophthalmol* 1973;89:466-471.
- Shields JA, McDonald PR. Improvements in the diagnosis of posterior uveal melanomas. *Arch Ophthalmol* 1974;91:259-264.
- Shields JA, McDonald PR, Leonard BC. The diagnosis of uveal melanomas in eyes with opaque media. *Am J Ophthalmol* 1977;82:95-105.
- Shields JA, Augsburger JJ, Brown GC. The differential diagnosis of posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 1980;87:518-522.
- Shields JA, Rodrigues MM, Sarin LK. Lipofuscin pigment over benign and malignant choroidal tumors. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1980;5:1-35.
- Shields JA, Sanborn GE, Augsburger JJ. The differential diagnosis of malignant melanoma of the iris. A clinical study of 200 patients. *Ophthalmology* 1983;90:716-720.
- Shields JA, Augsburger JJ, Arbizu V, Morrison JF Jr, Lucier AC. Malignant melanoma of the choroid in a husband and wife. *Br J Ophthalmol* 1984;68:623-625.
- Shields JA, Shields CL. Massive orbital extension of posterior uveal melanomas. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1991;7:238-251.
- Shields JA, Shields CL, Donoso LA. Current management of posterior uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1991;36:161-195.
- Shields JA, Shields CL. Intraocular tumors. A text and atlas. Philadelphia: WB Saunders Company; 1992.
- Shields JA, Shields CL. Management of posterior uveal melanoma. En: Shields JA, Shields CL. *Intraocular Tumors. A Text and Atlas*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1992;172-205.
- Shields JA, Shields CL, De Potter P. Local resection of posterior uveal tumors. *Int Ophthalmol Clin*; 1993;33:137-142.
- Shields JA, Shields CL, De Potter P. Approach to counseling patients with posterior uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:143-145.
- Shields JA. The place for eye wall resection and laser. Symposium; *Vitreoretinal Interfaces*. San Francisco;1994.
- Shih IE, Herlyn M. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 1993;100:196-203.
- Sieving PA. Fifteen years of work: The COMS outcomes for medium-sized choroidal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1067-1068.
- Silcock AQ. Hereditary sarcoma of the eyeball. *Trans Pathol Soc Lond* 1892;43:140-141.

- Silverman RH, Folberg R, Boldt HC, Lloyd HO, Rondeau MJ, Mehaffey MG, Lizzi FL, Coleman DJ. Correlation of ultrasound parameter imaging with microcirculatory patterns in uveal melanomas. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:573-81.
- Singh AD, Donoso LA. Genetic aspects of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:47-52.
- Singh AD, De Potter P, Fijal BA, Shields CL, Shields JA, Elston RC. Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo(dermal) melanocytosis. *Ophthalmology* 1998;105:195-198.
- Singh AD, Shields CL, Shields JA. Intraocular tumors. En: Gospodarowicz MK et al (eds). *Prognostic factors in cancer*. UICC. 2^a ed. Nueva Cork: Wiley-Liss, 2001:647-669.
- Sinicrope FA, Ruan SB, Clearly KR. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-241.
- Sisley K, Rennie IG, Parsons MA. Abnormalities of chromosome 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes chromosomes Cancer* 1997;19:22-28.
- Smith ML, Fornace AJ. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol* 1995;7:69-75.
- Smith ML, Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mut Res* 1996;340:109-124.
- Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227.
- Smolle J, Soyer HP, Kerl H. Proliferative activity of cutaneous melanocytic tumors defined by Ki-67 monoclonal antibody -a quantitative immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* 1989;11:301-307.
- Soini Y, Paakko P. Bcl-2 is preferentially expressed in tumours of muscle origin but is not related to p53 expression. *Histopathology* 1996;28:141-145.
- Solé-Balcells F, Chechile G, Algaba F. Carcinogénesis en general. En: *Biología molecular de los tumores urológicos*. Tema monográfico IX Congreso Nacional de Urología 1995:55.
- Soyer HP, Smolle J, Smolle-Juettner FM, Kerl H. Proliferation antigens in cutaneous melanocytic tumors -an immunohistochemical study comparing the transferrin receptor and the Ki 67 antigen-. *Dermatologica* 1989;179:3-9.
- Specht CS, Smith TW. Uveal malignant melanoma and von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer* 1988;62:812-817.
- Stallard HB. Pigmental tumors of the eye. Surgical aspects. *Proc R Soc Med* 1961;54:463.
- Stellar H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
- Sterhl KP, Rohrbach JM, Knorr M. Significance, specificity and ultrastructural localization of HMB-45 antigen in pigmented ocular tumors. *Ophthalmology* 1993;100:208-215.
- Straatsma BR, Fine SL, Earle JD. The Collaborative Ocular Melanoma Study Research Group. Enucleation versus plaque irradiation for choroidal melanoma. *Ophthalmology* 1988;95:1000-1004.
- Stretch JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991;51:5976-5979.

- Sunba MS, Rahi AHS, Morgan G. Tumors of the anterior uvea. I. Metastasizing malignant melanoma of the iris. *Arch Ophthalmol* 1980;98:82-85.
- Swerdlow AJ. Epidemiology of eye cancer in adults in England and Wales, 1962-1977. *Am J Epidemiol* 1983;118:294-300.
- Sy MS, Mori H, Liu D. CD44 as a marker in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1997;9:108-112.
- Tanaka S, Saito K, Reed JC. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:10920-10926.
- Territo C, Shields CL, Shields JA. Natural course of the melanocytic tumors of the iris. *Ophthalmology* 1988;95:1251-1255.
- Tobal K, Warren W, Cooper CS, McCartney A, Hungerford J, Lightman S. Increased expression and mutation of p53 in choroidal melanoma. *Br J Cancer* 1992;66:900-904.
- Tomita Y, Bilim V, Kawasaki T. Frequent expression of bcl-2 in renal-cell carcinomas carrying wild-type p53. *Int J Cancer* 1996;66:322-325.
- Tucker MA, Shields JA, Hartge P, Augsburger J, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Sunlight exposure as risk factor for intraocular malignant melanoma. *N Engl J Med* 1985;313:789-792.
- Uesugi H, Saegusa M, Takano Y. Different expression of bcl-2 protein in gastric adenomas and carcinomas. *Pathol Int* 1996;46:274-280.
- Ursea R, Coleman DJ, Silverman RH, Lizzi FL, Daly SM, Harrison W. Correlation of high-frequency ultrasound backscatter with tumor microstructure in iris melanoma. *Ophthalmology* 1998;105:906-912.
- Van den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am J Pathol* 1994;145:294-300.
- Versteeg R, Noordermeer IA, Kruse-Wolters M, Ruiter DJ, Schrier PI. C-myc down-regulates class I HLA expression in human melanomas. *EMBO-J* 1988;7:1023-1029.
- Vit VV. Prognostic role of morphologic characteristics of the immune response in uveal melanoblastomas of various cellular types. *Arch Patol* 1983;45:25-30.
- Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, Holzel D, Landthaler M, Stolz W. P-53 protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology* 1997;30:57-63.
- Wagener C, Bargou RC, Daniel PT. Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer* 1996;67:138-141.
- Waldmann V, Robes HM. What's new in ras genes? *Pathol Res Pract* 1996;192:883.
- Walsh SM, Egan KM, Gragoudas ES. An evaluation of the influence of reproductive factors on the risk of metastases from uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO Suppl)* 1992;33:980.
- Walton MI, Whysong D, O'Connor PM. Constitutive expression of human bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53:1853-1861.
- Wang MX, Earley JJ Jr, Shields JA, Donoso LA. An ocular melanoma-associated antigen: Molecular characterization. *Arch Ophthalmol* 1992;110:399-404.
- Wang MX, Shields JA, Donoso LA. Subclinical metastasis of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:119-127.

- Ward TP, McLean IW, Roberts AO. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in primary uveal melanoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1926.
- de Waard-Siebinga I, Hilders CG, Hansen BE. HLA expression and tumor-infiltrating immune cells in uveal melanoma. *Grafe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234:34-42.
- Webb CP, Van de Woude GF.: Genes that regulate metastases and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000; 50:71.
- Weil M, Jacobson M, Coles T. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996;128:1173-1184.
- Weiss J, Schwechheimer K, Cavenee WK, Herlyn M, Arden KC. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int J Cancer* 1993;54:693-699.
- Whelchel JC, Farah SE, McLean IW, Burnier MN. Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2603.
- White VA, Chambers JD, Courtright PD. Correlation of cytogenetic abnormalities with outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer* 1998;83:354-359.
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993;41:7-12.
- Wilder HC, Paul EV. Malignant melanoma of the choroid and ciliar body: A study of 2535 cases. *Mil Surg* 1951;109:370-378.
- Wilson RS, Fraunfelder FT. "No-touch" cryosurgical enucleation: A minimal trauma technique for eyes harboring intraocular malignancy. *Trans Am Acad Ophthalmol* 1978;85:1170-1175.
- Willson JKV. Systemic evaluation and management of a patient with a choroidal melanoma. En: Ryan SJ. *Retina*. San Luis: The C.V. Mosby Co;1989:729-731.
- Wiznia RA, Freedman JK, Mancini AD, Shields JA. Malignant melanoma of the choroid in neurofibromatosis. *Am J Ophthalmol* 1978;86:684-687.
- Wolff-Kormann PG, Kormann BA, Riedel KG, Hasenfratz GC, Stefani FH, Spengel FA, Lund OE. Quantitative color Doppler imaging in untreated and irradiated choroidal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1928-1933.
- Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Develop* 1995;5:97-104.
- Yanoff L, Zimmerman LE. Histogenesis of malignant melanoma of the uvea. III. The relationship of congenital ocular melanocytosis and neurofibromatosis to uveal melanomas. *Arch Ophthalmol* 1967;77:331-336.
- Yanoff M, Fine BS. *Ocular pathology*. Londres: Mosby-Wolfe, 1996.
- Young LH, Egan KM, Walsh SM, Gragoudas ES. Familial uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1994;117:516-520.
- Zanzami N, Susin A, Marchetti. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:1533-1544.
- Zhang KZ, Westberg JA, Holtta E, Anderson LC. Bcl-2 regulates neural differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:4504-4508.
- Zheng L, Lee W-H. The retinoblastoma gene: prototypic2 and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:2.

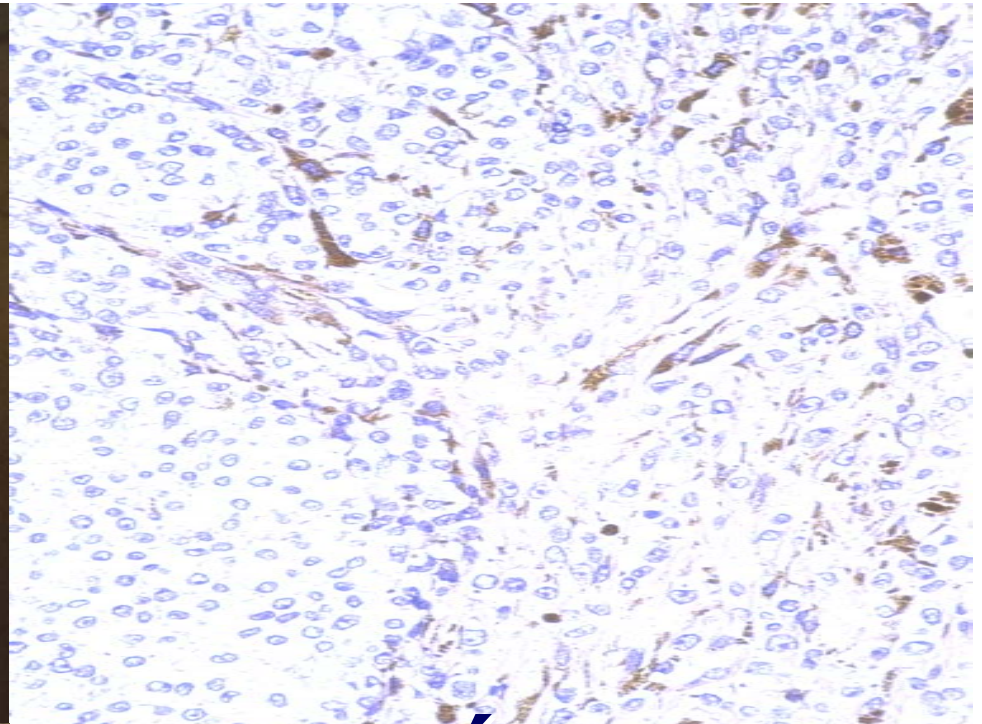
Zhu J, Nabissa PM, Hoffman B. Activated abl oncogenes and apoptosis; differing responses of transformed myeloid progenitor cell lines. *Blood* 1996;87:4368-4375.

Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells? *Br J Ophthalmol* 1978;62:420-425.

Zimmerman LE, McLean IW. An evaluation of enucleation in the management of uveal melanomas. *Am J Ophthalmol* 1979;87:741-760.

Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Statistical analysis of follow-up data concerning uveal melanomas and the influence of enucleation. *Ophthalmology* 1980;76:557.

Zimmerman LE. Malignant melanoma of the uveal tract. In: Spencer WH, Font RL, Green WR et al. *Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook*. Philadelphia: W.B. Saunders;1986:2084-2095.



CARACTERIZACIÓN PATOBIOLÓGICA DEL MELANOMA UVEAL

**TESIS DOCTORAL
María Matilla Rodero**

Málaga, 10 noviembre, 2003



MELANOMA UVEAL. DEFINICIÓN

**Tumor maligno de melanocitos no siempre pigmentado
(Zimmerman 1985)**

**Melanosarcoma / Melanocarcinoma
Leucosarcoma / Angiosarcoma
Sarcoma de células gigantes**

MELANOMA UVEAL. INCIDENCIA

6 casos / 1.000.000 habitantes

Tumor maligno primario intraocular (más frecuente en adultos)

- Iris (8%)**
- Cuerpo ciliar (12%)**
- Coroides (80%)**

Edad: 50-70 años

Sexo: 6 H / 4 M

20-40 años: > frecuencia en mujeres

Raza: Blanca (8/1)

MELANOMA UVEAL. FACTORES ETIOLÓGICOS

Pigmentación iridiana

Lesiones predisponentes: **Nevus (+)**
Melanocitosis (++++)

Factores genéticos: **Casos familiares raros (AD)**

Patologías asociadas: **Síndrome del nevus displásico**
Neurofibromatosis
Xeroderma pigmentosum

MELANOMA UVEAL. FACTORES ETIOLÓGICOS

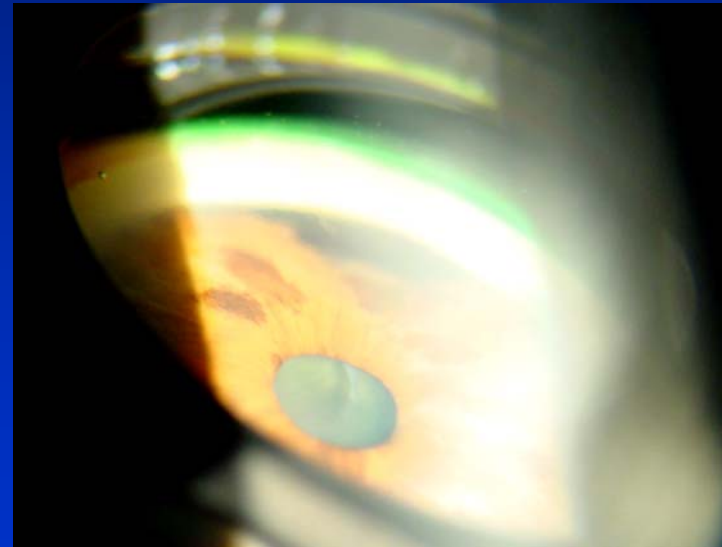
Situación hormonal:	Embarazo (↑ MSH)
Inmunocompetencia:	Disminuida
Factores ambientales:	Nivel socioeconómico Factores geográficos Radiación solar Exposiciones ocupacionales Otros: virus, traumas, connubial

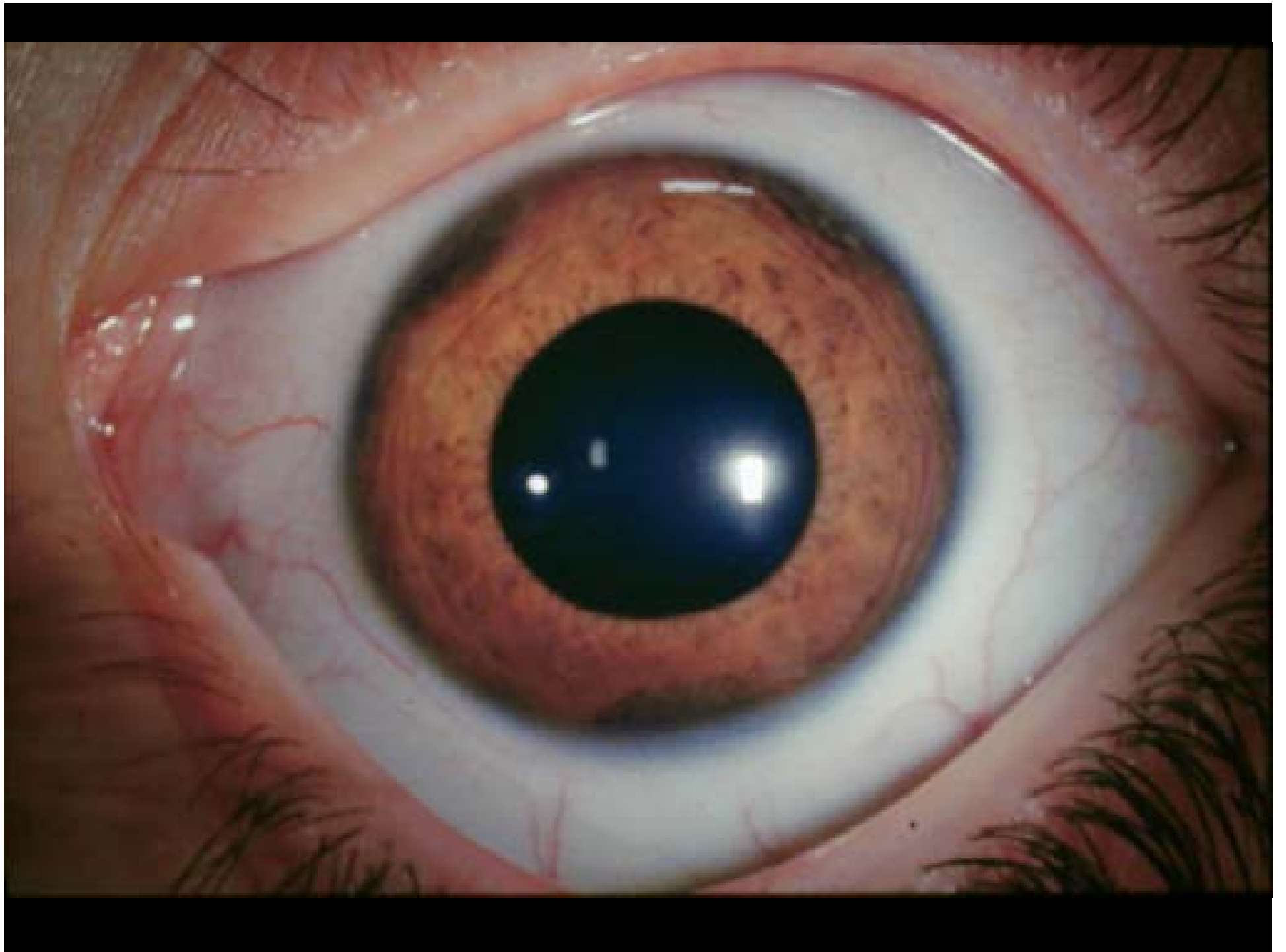
MELANOMA UVEAL. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Iris: circunscrito o difuso

Cuerpo ciliar

Coroides





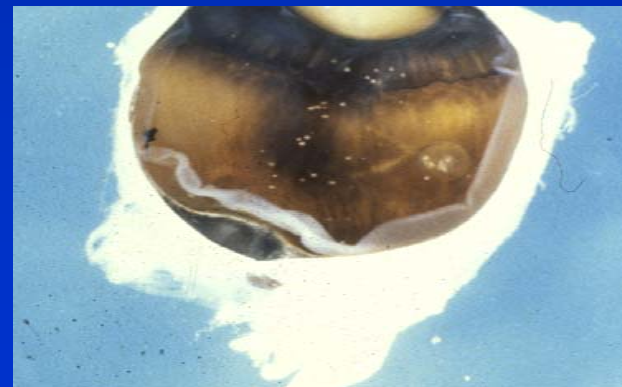


MELANOMA UVEAL. HISTORIA NATURAL

Lesiones precursoras

Crecimiento y extensión local

Metástasis (hígado)



MELANOMA UVEAL. CLASIFICACION DE CALLENDER (1942)

- **Celularidad**

Fusiformes A (6%)

Epitelioide (2%)

Fusiforme B (32%)

Mixto (48%)

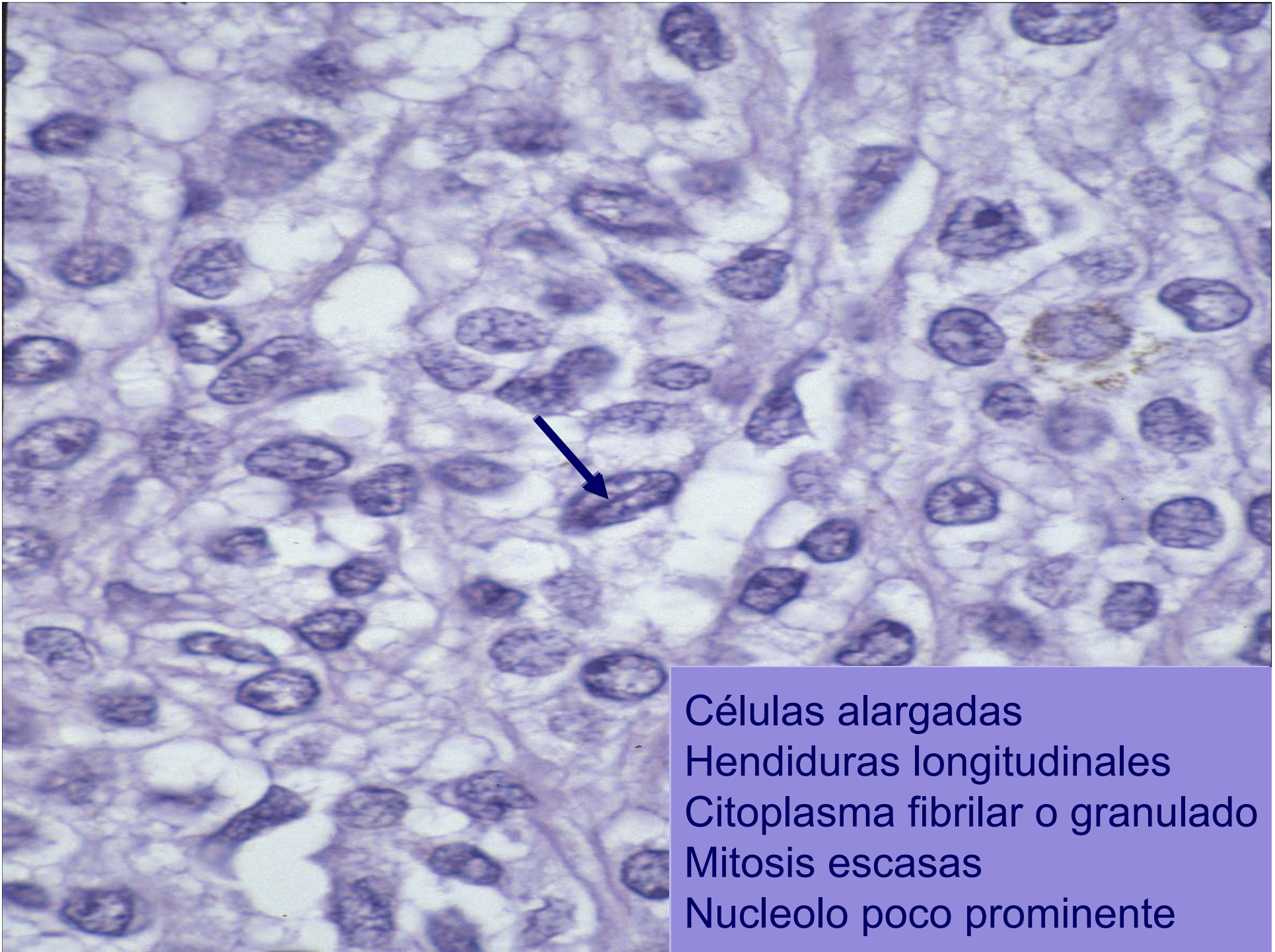
- **Patrón histológico**

Fascicular (5%)

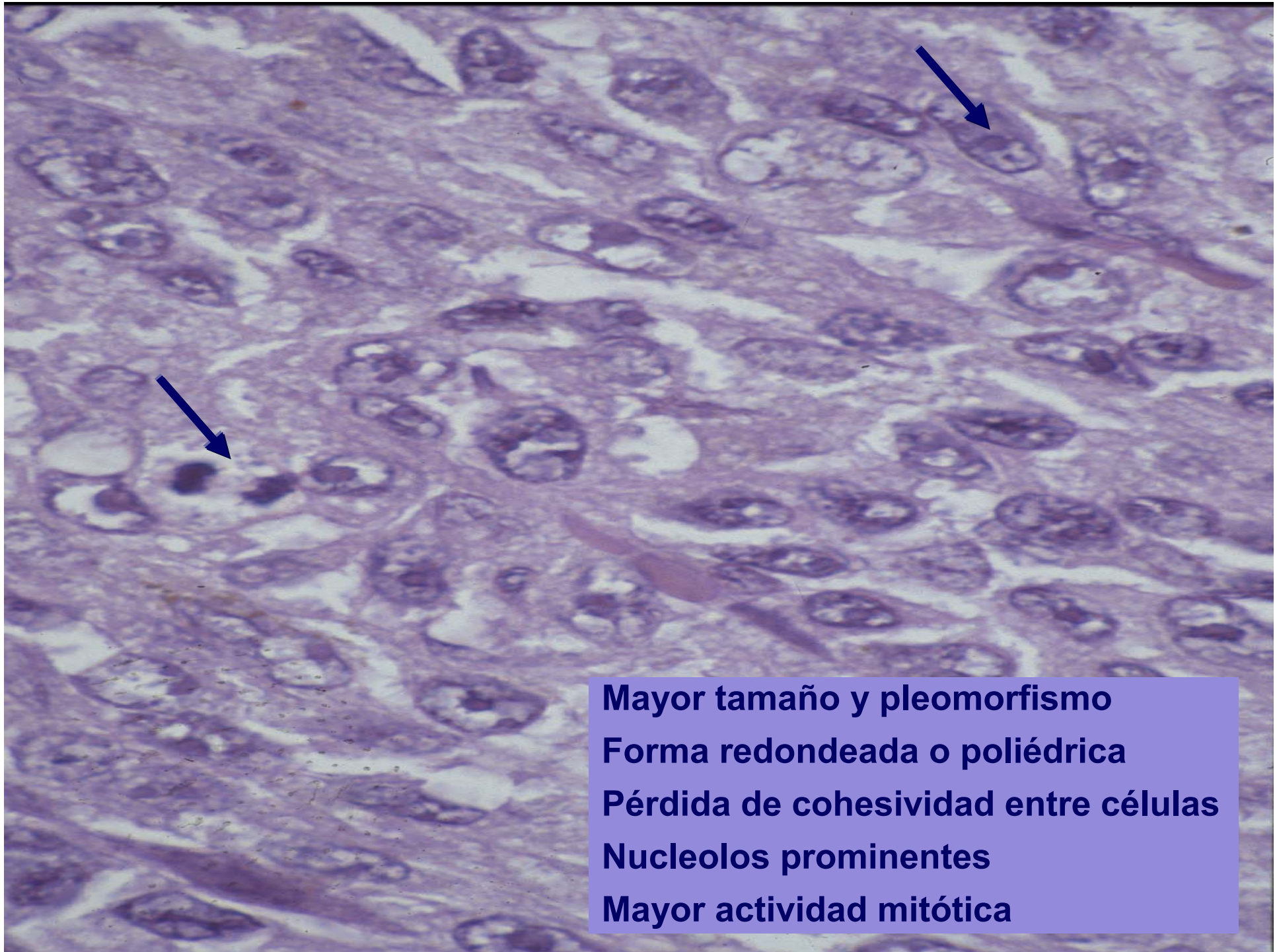
Necrótico (8%)

MELANOMA UVEAL. CLASIFICACION DE CALLENDER MODIFICADA

- Fusiformes (A y B)
- Epitelioides y mixtos ~~Fasciular~~
- Necrótico



Células alargadas
Hendiduras longitudinales
Citoplasma fibrilar o granuloso
Mitosis escasas
Nucleolo poco prominente



Mayor tamaño y pleomorfismo
Forma redondeada o poliédrica
Pérdida de cohesividad entre células
Nucleolos prominentes
Mayor actividad mitótica

MELANOMA UVEAL. DIAGNÓSTICO

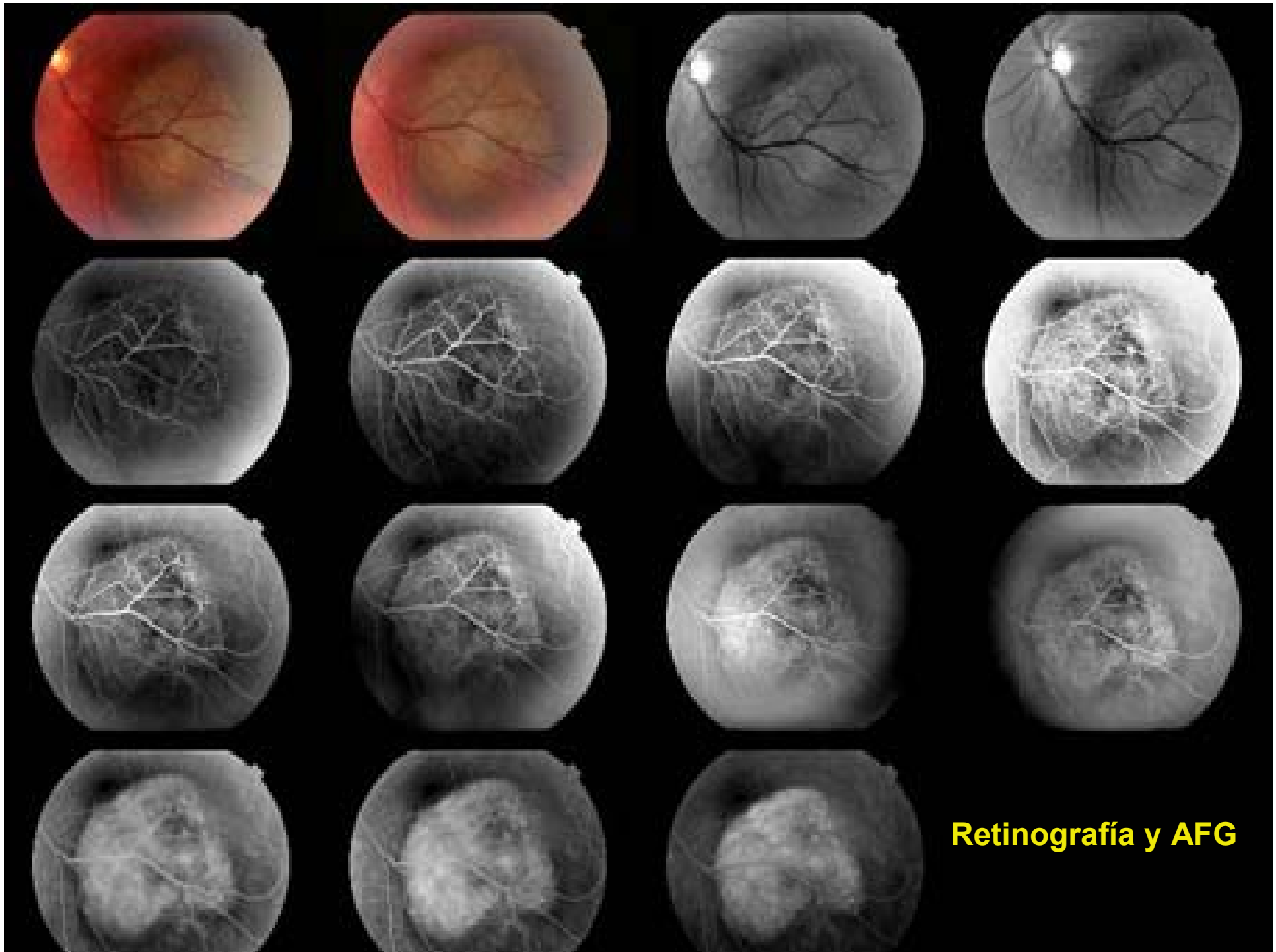
Exploración:

Lámpara de hendidura

Fondo de ojo

Gonioscopia

Documentar el crecimiento



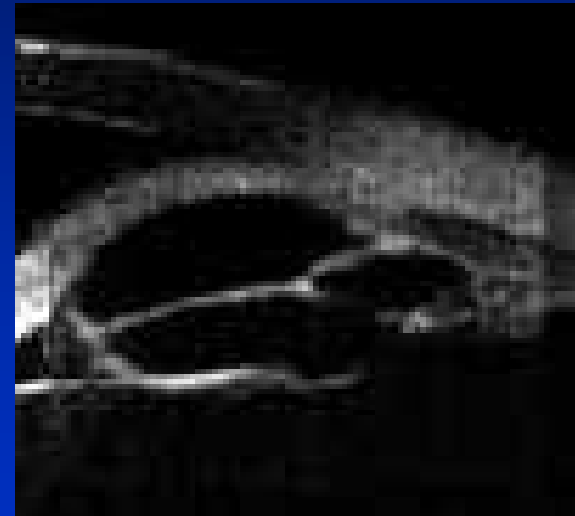
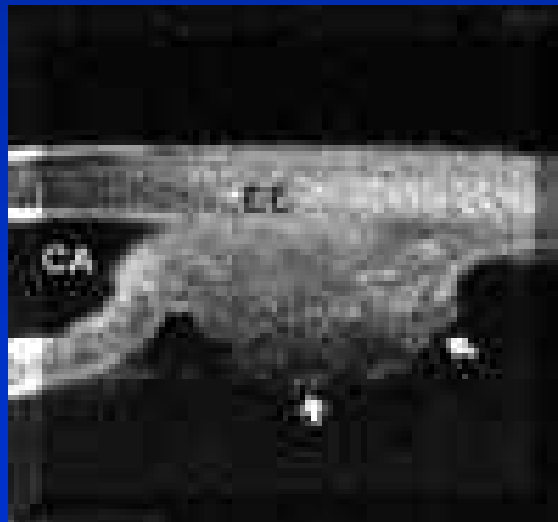
Retinografía y AFG

MELANOMA UVEAL. DIAGNÓSTICO

TC / RMN

Ecografía:

- Técnica complementaria más importante (COMS 1990)
- Convencional (A y B), doppler, BMU



MELANOMA UVEAL. DIAGNÓSTICO

Citología (PAAF) y biopsia (intraocular):

- H-E
- Inmunohistoquímica: VIM, S-100, HMB-45, melan A

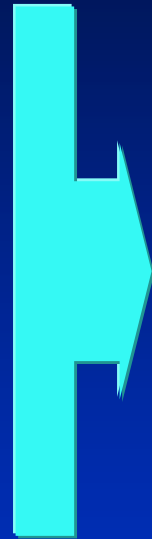
MELANOMA UVEAL. TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN

Melanoma de iris

Resección

Radioterapia

Enucleación



Tamaño

Ojo contralateral

Localización

Edad

Ojo único?

Características del paciente

Supervivencia: 95% a 5 años

Metástasis: sólo el 3% (media 6.5 años)

MELANOMA UVEAL. TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN

Melanoma de úvea posterior

Resección local

RT con partículas cargadas

Braquiterapia

Enucleación

Fotocoagulación, TTP

Tamaño

Ojo contralateral

Localización

Edad

Ojo único?

Características del paciente

Supervivencia: 50% a 10-15 años

Metástasis: 5 años tras el tratamiento

Tras metástasis: 2 - 4 meses

MELANOMA UVEAL.FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS

Localización del tumor

(Malignidad: c. ciliar > coroides > iris)

Tamaño del tumor

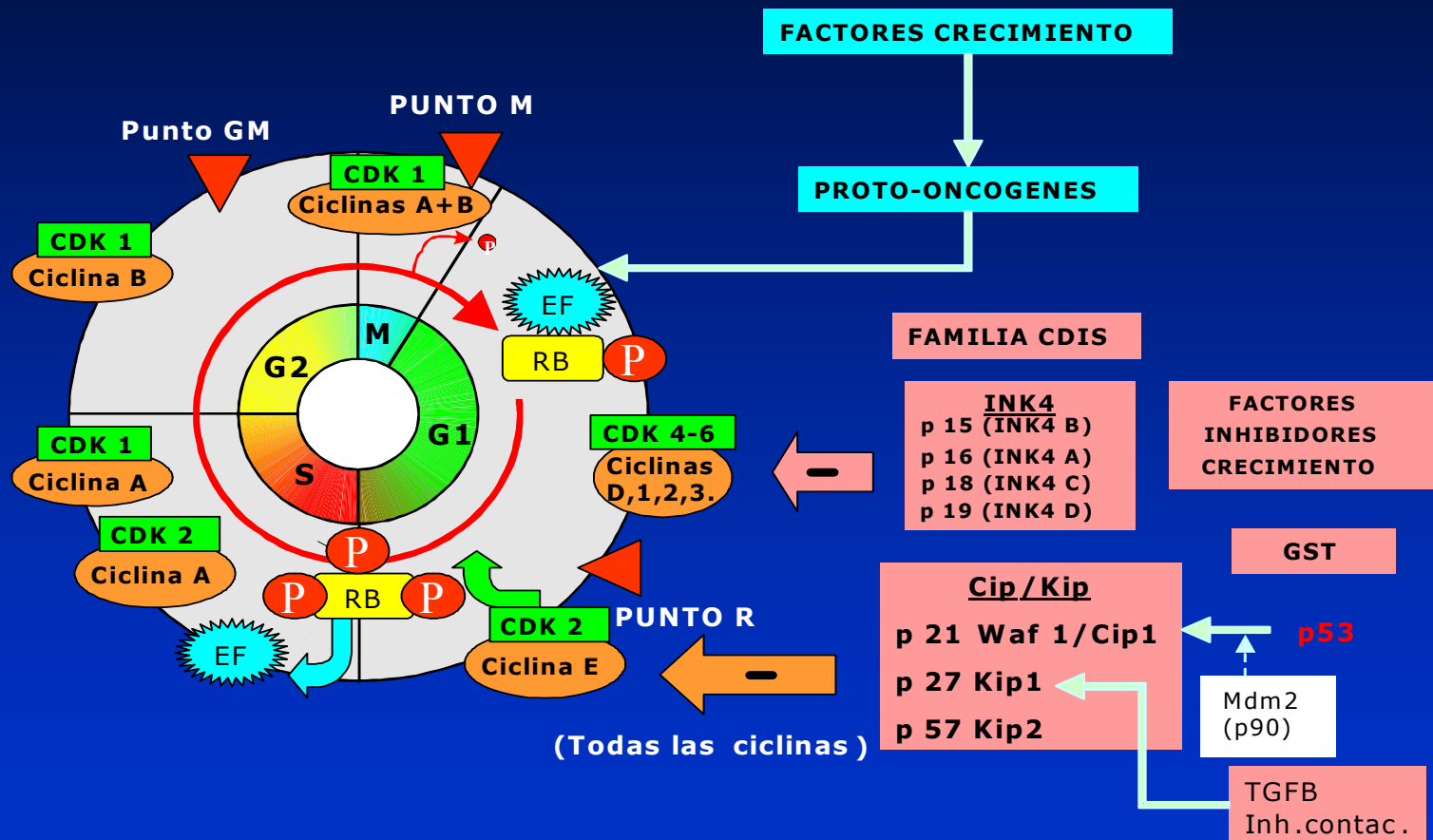
Configuración del tumor

(Difuso, cercanía al NO: peor pronóstico)

MELANOMA UVEAL. FACTORES PRONÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS

<i>Categoría</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Seguimiento</i>	<i>Resultados (%)</i>	<i>Autor</i>	<i>Año</i>
<i>Tipo celular</i>	<i>Fusiforme</i>	Mortalidad 15 años	20	McLean	1982
	<i>Mixto</i>	Mortalidad 15 años	60	McLean	1982
	<i>Epitelial</i>	Mortalidad 15 años	75	Shammas	1977
<i>Actividad mitótica</i>	<i>Baja</i>	Mortalidad 6 años	16	McLean	1977
	<i>Media</i>	Mortalidad 6 años	32	McLean	1977
	<i>Intensa</i>	Mortalidad 6 años	53	McLean	1977
<i>Vascularización</i>	<i>Ausente</i>	Mortalidad 10 años	10	Folberg	1993
	<i>Presente</i>	Mortalidad 10 años	50	Folberg	1993
<i>Infiltrado linfocitario tumoral</i>	<i>Escaso</i>	Mortalidad 15 años	30	De la Cruz	1990
	<i>Intenso</i>	Mortalidad 5 años	62	De la Cruz	1990
<i>Extensión extraescleral</i>	<i>Ausente</i>	Mortalidad 10 años	37	Seddon	1983
	<i>Presente</i>	Mortalidad 10 años	75	Seddon	1983

FACTORES PATOBIOLOGICOS DEL CÁNCER



MELANOMA UVEAL.FACTORES PRONÓSTICOS PATOBIOLOGÍCOS

<i>Categoría</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Autor</i>
<i>Proliferación celular:</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>NOR</i> - <i>Aneuploidía (CF)</i> - <i>Expresión de Ki-67/Mib-1</i> - <i>Expresión de PCNA</i> 	Elevado nº de AgNOR Índice de ADN alto Expresión elevada Expresión elevada	Marcus (1990) Meecham (1986) Mooy (1995) Seregard (1996)
<i>Antígenos de histocompatibilidad</i>	Alta expresión de HLA-A (dificulta la extirpación de microMTX por las NK)	Jager (1986)
<i>Citogenética</i>	Monosomía 3 (cuerpo ciliar) Duplicación 8q (cuerpo ciliar) Cromosoma 6 (coroides)	White (1998) White (1998)
<i>Genética Molecular</i>	Expresión de c-myc	Mooy (1995)

CLASIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS

Identificar los tumores más agresivos,
con mayor capacidad para metastatizar
con el fin de individualizar el tratamiento
y mejorar la supervivencia

PLANTEAMIENTO DEL TEMA. OBJETIVOS

- a) Conocer las *características clínicas, citológicas y patobiológicas* de una amplia serie de melanomas uveales primarios.
- b) Comprobar si el *inmunofenotipo* del melanoma uveal es semejante al del melanoma cutáneo.
- c) Conocer la interrelación entre los *aspectos citohistopatológicos* del tumor y diferentes *parámetros patobiológicos*, tales como el perfil inmunohistoquímico de proliferación (Ki-67), de expresión de oncogenes (bcl-2, c-erb-B2) y de genes supresores (p53)

MATERIAL Y MÉTODOS. MUESTRA

- **56 melanomas uveales primarios (1975-2003)**
 - Hospital Clínico Universitario (Málaga)
 - Hospital Carlos Haya (Málaga)
 - Hospital Virgen Macarena (Sevilla)
 - Hospital General Torrecárdenas (Almería)
- **Edad (<40, 40-60, >60 años) y sexo**

MATERIAL Y MÉTODOS. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO CONVENCIONAL

Variables:

Tipo celular	Necrosis	Pigmentación	Pleomorfismo	Prominencia nucleolar	Hendiduras nucleares	Mitosis
Fusocelular	Ausencia	<20%	Escaso	Ausencia	No	No
Epiteliode	Areas	20-75%	Moderado	Ligera	Sí	Escasas
Mixto	Masiva	>75%	Intenso	Intensa		Frecuentes

MATERIAL Y MÉTODOS. INMUNOHISTOQUIMICA

- Marcadores de diferenciación

Vimentina, proteína S-100, antígeno melánico HMB-45 y MELAN A

- Marcadores de proliferación celular

Ki-67 (Clona MIB-1). Valoración: <5%, 5-20%, >20%

- Reguladores de la proliferación celular

Bcl-2. Valoración: Positivo/Negativo

C-erb-B2. Valoración: No se observa tinción (Negativo)

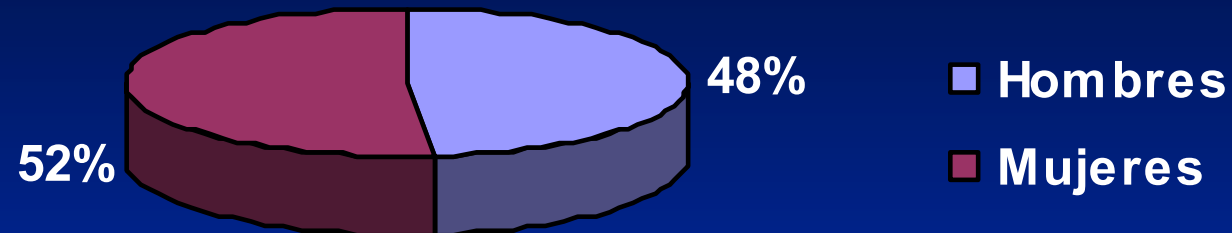
Tinción débil e incompleta de membrana en más de un 10% de las céls tumorales (Negativo).

Tinción moderada de membrana en todas las células tumorales.(Positivo)

Tinción fuerte de membrana en más de un 10% de las céls tumorales. (Positivo)

p53 (clona DO7). Valoración: Positivo/Negativo

MELANOMA UVEAL. RESULTADOS



Grupos etáreos	Nº de casos	Porcentaje (%)
<40 años	11	19,6
40 a 60 años	24	42,9
>60 años	21	37,5
Total	56	100,0

Edad media: 64,1 +/- 7,3 años

MELANOMA UVEAL. RESULTADOS

Edad y sexo

		SEXO		
		Hombres	Mujeres	Total
Edad (años)	<40	4	7	11
	40 a 60	14	10	24
	>60	9	12	21
Total		27	29	56



23 vs 22

Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1988;32:239-251

Seddon JM, Egan K, Gragoudas ES. Uveal melanoma prognosis. En Ryan SJ: *Retina*. San Luis: Mosby; 1994

MELANOMA UVEAL. LOCALIZACION Y PATRÓN HISTOLÓGICO

Localización	Nº de casos	Porcentaje (%)
Iris	4	7,1
Coroides	46	82,1
Cuerpo ciliar	6	10,7
Total	56	100,0

Callender 1942

Fusiforme (38%)

Epiteliode (2%)

Mixto (48%)

Patrón histológico	Nº de casos	Porcentaje (%)
Fusocelular	29	51,8
Epitelial	10	17,9
Mixto	16	28,6
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

Mixto si > 5% de células epitelioides

MELANOMA UVEAL. TAMAÑO TUMORAL

TAMAÑO					
	Nº de casos	Media	DT	Mínimo	Máximo
<i>Iris</i>	3	3,833	2,0207	1,5	5,0
<i>Coroides</i>	44	1,970	1,7727	1,0	9,0
<i>Cuerpo ciliar</i>	6	3,183	3,0301	1,1	9,0
Total	53	2,213	1,9871	1,0	9,0

Significación estadística. p= 0,130

Tamaño: 2.21+/-1.98 cm
(rango 1-9 cm)

MELANOMA UVEAL. PATRÓN HISTOLÓGICO vs. HENDIDURAS LONGITUDINALES

		<i>Patrón histológico</i>				
		Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total	
<i>Hendiduras nuclear longitudinales</i>	No	Nº casos	18	10	16	44
		%	32,7%	18,2%	29,1%	80,0%
	Si	Nº casos	11			11
		%	20,0%			20,0%
Total	Nº casos	29	10	16	55	
	%	52,7%	18,2%	29,1%	100,0%	

Significación estadística: $p < 0,000$

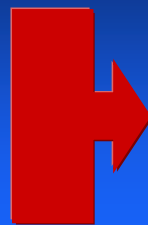
MELANOMA UVEAL. PATRÓN HISTOLÓGICO vs. GRADO DE PIGMENTACIÓN

		<i>Patrón histológico</i>				
		<i>Fusocelular</i>	<i>Epitelial</i>	<i>Mixto</i>	Total	
Melanina	<20	Recuento	16	4	2	22
		% del total	29,7%	7,4%	3,7%	40,7%
	20 -75	Recuento	7	5	6	18
		% del total	13,0%	9,3%	11,1%	33,3%
	>75	Recuento	5	1	8	14
		% del total	9,3%	1,9%	14,8%	25,9%
Total		Recuento	28	10	16	54
		% del total	51,8%	18,5%	29,6%	100,0%

Significación estadística: p= 0,04

Factor pronóstico para algunos autores:

- Mc Lean et al 1977
- Schwartzman et al 1993
- Yanoff y Fine 1996



Grado de pigmentación muy variable incluso dentro de un mismo tumor

MELANOMA UVEAL. PATRÓN HISTOLÓGICO vs. PLEOMORFISMO CELULAR/NUCLEAR

		<i>Patrón histológico</i>				
		Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total	
<i>Pleomorfismo celular/nuclear</i>	Escaso	Nº de casos	11		11	
		% del total	1,8%		20,0%	
	Moderado	Nº de casos	16	9	12	37
		% del total	29,1%	16,4%	21,8%	67,3%
	Intenso	Nº de casos	2	1	4	7
		% del total	3,6%	1,8%	7,3%	12,7%
Total	Nº de casos	19	10	16	55	
	% del total	52,7%	18,2%	29,1%	100,0%	

Significación estadística p= 0,000

MELANOMA UVEAL. PATRÓN HISTOLÓGICO VS. PROMINENCIA NUCLEOLAR

		<i>Patrón histológico</i>				
		Fusocelular	Epitelial	Mixto	Total	
<i>Prominencia nucleolar</i>	Ausencia	Nº de casos	12	1	13	
		% de casos	21,9%	1,8%	23,6%	
	Ligera	Nº de casos	17	6	14	37
		% de casos	30,9%	10,9%	25,5%	67,3%
	Intensa	Nº de casos	3	2	5	
		% de casos	5,5%	3,6%	9,1%	
Total	Nº de casos	29	10	16	55	
	% de casos	52,7%	18,2%	29,1%	100,0%	

Significación estadística: $p < 0,006$

Mc Lean et al 1983: tamaño nucleolar como factor pronóstico

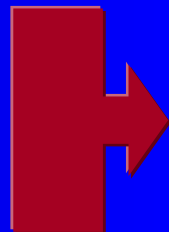
MELANOMA UVEAL. PATRÓN HISTOLÓGICO vs. MITOSIS

		<i>Patrón histológico</i>				
		<i>Fusocelular</i>	<i>Epitelial</i>	<i>Mixto</i>	Total	
Mitosis	<i>No identificables</i>	Recuento	23	2	1	26
		% del total	43,6%	3,7%	1,9%	48,1%
	<i>Escasas</i>	Recuento	5	6	15	26
		% del total	9,3%	11,1%	27,8%	48,1%
	<i>Frecuentes</i>	Recuento		2		2
		% del total		3,7%		3,7%
Total		Recuento	28	10	16	54
		% del total	51,8%	18,5%	29,6%	100,0%

Significación estadística: $p < 0,000$

Concordancia de nuestros resultados:

- Mc Lean et al 1995
- Shields et al 1992
- Yanoff y Fine 1996



**Epiteliode y mixto
mayor frecuencia de
figuras mitóticas**

MELANOMAS UVEALES. MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN

Los melanomas de la úvea presentan el mismo patrón de inmunotinción que los melanomas cutáneos

MELANOMA UVEAL. Expresión ki-67

<i>Ki-67</i>	Nº casos	Porcentaje
Menor 5%	38	67,9
Entre 5% y 20%	14	25,0
Mayor de 20%	3	5,4
Perdidos del sistema	1	1,8
Total	56	100,0

		<i>Índice de proliferación Ki-67</i>				
		<5%	5%-20%	>20%	Total	
Mitosis	No identificables	Nº de casos	20	4	2	26
		% de casos	37,0%	7,4%	3,7%	48,1%
	Escasos	Nº de casos	16	9	1	26
		% de casos	29,6%	16,7%	1,9%	48,1%
	Frecuentes	Nº de casos	1	1		2
		% de casos	1,9%	1,9%		3,7%
Total		Nº de casos	37	14	3	54
		% de casos	68,5%	25,9%	5,6%	100,0%

Significación estadística: p>0,50

MELANOMA UVEAL. SOBREEXPRESIÓN DE C-erb-B2

No se observó tinción de membrana (de forma continua), reflejo de la sobreexpresión de la proteína c-erb-b2, en ninguno de los melanomas uveales de la serie.

Las alteraciones en estos receptores de membrana celular no sea un hecho relevante en la carcinogénesis del melanoma uveal

MELANOMA UVEAL. PLEOMORFISMO CELULAR/NUCLEAR vs Bcl-2

Hallazgo común en lesiones melanocíticas (41.1%)

Independiente de su patrón celular y de su conducta biológica

- Cerroni et al (1995)
- Jay et al (1996)
- Hockenbery et al (1991)

Escaso valor como factor pronóstico

MELANOMA UVEAL. PROTEÍNA p53

No se observó positividad para p53 en más del 10% de las células tumorales de los melanomas uveales de la serie.

La inactivación mutacional de la p53 no sería el suceso inicial en la carcinogénesis del melanoma uveal. Su detección en un escaso porcentaje de casos hace pensar que se trataría de una **mutación adquirida de forma tardía en el proceso de transformación neoplásica.**

CONCLUSIONES