



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Departament de Ciències Morfològiques
Facultat de Medicina**

**ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE 4E-BP1.
IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS EN EL
MELANOMA UVEAL.**

Memoria de tesis doctoral presentada por M. Carme Dinarès
Fernández para optar al grado de doctora por la Universitat Autònoma
de Barcelona.

Trabajo realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital
Universitari Vall d'Hebron, bajo la dirección del Prof. Santiago Ramón y
Cajal Agüeras y el Dr. Javier Hernández Losa.

Barcelona, 2017

Doctoranda

Director

Codirector

M. Carme Dinarès
Fernández

Santiago
Ramón y Cajal
Agüeras

Javier Hernández
Losa

Barcelona, 2017

El Prof. Santiago Ramón y Cajal Agüeras, catedrático del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA:

Que Doña M. Carme Dinarès Fernández ha realizado bajo la dirección de los abajo firmantes el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE 4E-BP1. IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS EN EL MELANOMA UVEAL.

Revisado el presente trabajo, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Prof. Santiago Ramón y Cajal

Barcelona, 2017

Directores de la tesis:

Prof. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Departamento Anatomía Patológica

H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

Dr. Javier Hernández Losa

Departamento Anatomía Patológica

H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

A en Josep i en Bernat, amb l'amor d'una mare.

A en Ricard, amb l'amor d'una esposa.

A en Josep i la Carme, amb l'amor d'una filla.

A Carlos, porque un día dijiste que pintaba bien...

“Nuestras horas son minutos cuando esperamos saber, y siglos cuando sabemos lo que se puede aprender.”

Antonio Machado (1875-1939)

I. ÍNDICE

I.	ÍNDICE	1
II.	SIGLAS Y ABBREVIATURAS	7
III.	INTRODUCCIÓN	15
1.	La úvea. Anatomía e histología	17
1.	1. Iris	17
2.	2. Cuerpo ciliar	18
3.	3. Coroides	19
2.	Tumores melanocíticos del tracto uveal	20
1.	1. Melanocitos de la úvea: definición	20
2.	2. Embriología	20
3.	3. Lesiones melanocíticas de la úvea	20
3.	Melanoma Uveal	21
1.	1. Epidemiología	21
2.	2. Presentación Clínica, macroscopía tumoral y diagnóstico diferencial	22
3.	3. Extensión local y metástasis	27
4.	4. Diagnóstico	28
5.	5. Histopatología	29
1.	1. Variantes citológicas	31
2.	2. Inmunohistoquímica	32
3.	3. Clasificación del melanoma uveal	33
1.	1. Callender y Callender Modificada	34
2.	2. American Joint Committee on Cancer	35
6.	6. Tratamiento	37
1.	1. Control local de la neoplasia primaria	38
2.	2. Control sistémico de la neoplasia diseminada	39
7.	7. Factores pronósticos	41
1.	1. Clínicos	42
1.	1. Edad y sexo	42
2.	2. Localización y configuración tumoral	43
3.	3. Tamaño tumoral y estadiaje (AJCC)	44
4.	4. Asociación con melanocitosis ocular u oculodérmica	45

2. Histológicos	45
1. Tipo celular y tamaño nuclear	45
2. Actividad mitótica	46
3. Patrón y densidad vascular	46
4. Infiltrado inflamatorio	47
5. Necrosis y pigmentación	48
3. Citogenéticos y moleculares	48
1. Alteraciones citogenéticas	48
2. Alteraciones moleculares	52
4. Patogénesis del cáncer (hallmarks)	54
5. Patogénesis del melanoma uveal	56
6. Vías de RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) Y PI3K-AKT-mTOR en cáncer	59
1. Vía MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)	59
2. Vía PI3K-AKT-mTOR	64
7. Vías de RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) Y PI3K-AKT-mTOR en MU	70
8. Modelo de progresión tumoral en MU	71
1. Modelo de progresión basado en alteraciones genéticas	71
2. Modelo de progresión basado en alteración de vías de señalización	72
IV. HIPÓTESIS	75
V. OBJETIVOS	79
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	83
1. Características clínico-patológicas y seguimiento	85
2. Creación de Matrices de Tejido	86
3. Procesado inmunohistoquímico	86
4. Evaluación inmunohistoquímica	87
5. Líneas celulares y cultivo celular	88
6. Fármacos	89
7. Determinación IC50 de los fármacos	89
8. Ensayos de viabilidad celular frente a la administración de fármacos	91
9. Ensayo de formación de colonias de combinación de fármacos	92

10. Curvas de crecimiento. Nivel de duplicación de la población	92
11. Ensayo de migración celular In vitro. Wound healing	93
12. Análisis descriptivo y estadístico	93
13. Análisis exploratorio de datos	94
VII. RESULTADOS	97
1. Datos clínico-patológicos y seguimiento. Análisis descriptivo	99
2. Signaling. Análisis descriptivo	103
3. Análisis estadístico	109
1. Marcadores asociados con variables clínicas	109
2. Análisis del periodo libre de enfermedad (periodo libre de metástasis)	111
1. Comparación de variables clínicas	112
2. Comparación de variables “signaling”	118
3. Multivariante variables “signaling” + variables clínicas	119
3. Análisis del periodo libre de éxitus por enfermedad	120
1. Comparación de variables clínicas	121
2. Comparación de variables “signaling”	127
3. Multivariante variables “signaling” + variables clínicas	131
4. Análisis de supervivencia global	131
1. Comparación de variables clínicas	132
2. Comparación de variables de “signaling”	138
3. Multivariante variables “signaling” + variables clínicas	140
4. Análisis mediante AutoDiscovery	141
5. Ensayos in vitro	147
1. Resultados de la determinación de fármaco a IC50	147
2. Resultados de la combinación de fármacos	148
1. Resultados de la viabilidad celular y ensayo de formación de colonias para combinaciones de fármacos en UW1	148
2. Resultados de la viabilidad celular y ensayo de formación de colonias para combinaciones de fármacos en MKTBR	150
3. Resultados de la viabilidad celular y ensayo de formación de colonias para combinaciones de fármacos en OCM1	151

3. Proliferación basal, migración y habilidad para formación de colonias de UW1, MKTBR y OCM1	152
VIII. DISCUSIÓN	155
IX. CONCLUSIONES	169
X. REFERENCIAS	173
XI. AGRADECIMIENTOS	193

II. SIGLAS Y ABREVIATURAS

II. SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desóxidoribonucleico (<i>DNA</i>)
AGC	Familia de quinasas enlazadas a proteína G
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteína quinasa B o PBK
ARN	Ácido ribonucleico (RNA)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero (mRNA)
AXL	Receptor tirosina-quinasa de clase IX (Receptor de la familia AXL)
AZT8330	Fármaco inhibidor de tirosina quinasa de MEK
Bcl-2	Proteína de B-cell lymphoma 2. Codificada en el gen <i>BCL-2</i>
BCL2	Protooncogén B-cell lymphoma 2
BMU	Biomicroscopía ultrasónica anterior
BRAF	Protooncogén <i>B-Raf</i>
BRCA	Gen supresor de tumor <i>BRCA</i>
°C	Grados centígrados
CD68	Cúmulo de diferenciación 68 (<i>cluster of differentiation 68</i>)
CD163	Cúmulo de diferenciación 163 (<i>cluster of differentiation 163</i>)
CDK2	Quinasa dependiente de ciclina 2
CDK4	Quinasa dependiente de ciclina 4
CDK6	Quinasa dependiente de ciclina 6
CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>) Gen de <i>P16</i> .
CFU	Unidades formadoras de colonias (<i>Colony forming units</i>)
CGA	Campo de gran aumento
CGH	Hibridación genómica comparada
CI	Índice de combinación (<i>Combinatorial Index</i>)
CK	Citoqueratina
cm ²	Centímetros cuadrados
C-MYC	Protooncogén <i>c-Myc</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Cr	Cromosoma

DMN	Diámetro medio de diez nucléolos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Duplicación de la población
DTIC	Dacarbacina (<i>Dacarbazine</i>)
4E-BP1	Eukariotic initiation factor 4E-binding protein
EDTA	Ácido etilendiaminotertraacético
EFS	<i>Embryonal Fyn-associated Substrate gene</i>
EIF-4A	Eukariotic initiation factor 4A
EIF-4E	Eukariotic initiation factor 4E
EIF-4F	Eukariotic initiation factor 4F
EIF-4G	Eukariotic initiation factor 4G
ej.	Ejemplo
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinasa</i>
FGFR2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i> . Receptor tirosina-quinasa de clase V (Receptor de la familia FGF)
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
GLUT-1	Transportador de glucosa 1 (<i>Glucose transporter 1</i>)
GNA11	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11</i>
GNA11	(<i>Protein coding</i>) <i>G protein subunit alpha 11</i>
GNAQ	Guanine nucleotid-binding protein G(q) subunit alpha
GNAQ	(<i>Protein coding</i>) <i>G protein subunit alpha Q</i>
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTPasa	Enzima hidrolasa-guanosina-trifosfato (<i>Hydrolase guanosine triphosphate enzyme</i>)
HDAC	Histona desacetilasa
HE	Hematoxilina-eosina
HER	Receptor del factor de crecimiento epitelial humano
HLA	Antígeno leucocitario humano
HMB-45	(anti-gp100) Anticuerpo monoclonal que identifica melanosomas inmaduros
HR	Hazard ratio
HUVH	Hospital Universitari Vall d'Hebron

ic	intervalo de confianza
IC	Concentración inhibitoria (<i>Inhibitory concentration</i>)
IC50	Half inhibitory concentration
IgG	Inmunoglobulina G
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 receptor (Receptor tirosina-quinasa de clase II).
IgM	Inmunoglobulina M
IHQ	Inmunohistoquímica/o
IL-2	Interleucina-2
IMO	Instituto de Microcirugía Ocular
IUD	institut Universitari Dexeus
JNK	Quinasa c-JUN N-terminal
LIT	Componente linfocitario infiltrativo tumoral
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKi	inhibidor de la ruta de MAPK
MART-1	Gen que codifica el antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (Melan-A). La proteína recibe el mismo nombre
MAT	Componente macrofágico asociado al tumor
MCE	Muerto con enfermedad
MDM2	Gen <i>MDM2</i> que codifica la proteína Ubiquitina ligasa E3 (<i>Murine doble minute 2 protein</i>)
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MELAN-A	Antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (marcador inmunohistoquímico de melanoma)
MET	Receptor tirosina-quinasa de clase VI (Receptor de la familia HGF-hepatocyte growth factor)
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
MIB1(KI67)	Anticuerpo IgG1 frente a Ki67. Marcador de proliferación celular

MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
MSA	Análisis de microsatélites
MSE	Muerto sin enfermedad
mTOR	Mamalian target of rapamycin
mTORC 1/2	Complejo proteico 1/2 de mTOR
mTORi	inhibidor de mTOR
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrezolium bromide
MU	Melanoma uveal
MUM	Melanoma uveal metastásico
MUP	Melanoma uveal posterior
n	Muestra
NAD(P)H	enzima que cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD ⁺ o NADP ⁺
NEDD4	Proteína ubiquitina ligasa E3 (<i>Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4</i>)
NDP	Nivel de duplicación de la población acumulada
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
NRDP1	Proteína ubiquitina ligasa E3 (<i>Neuregulin Receptor Degradation Protein-1</i>)
NSE	Enolasa neuronal específica
OCT	Tomografía de coherencia óptica
OS	Supervivencia (Overall survival)
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i> . Tinción de ácido peryodico schiff.
PBS	Phosphate buffer solution
PC-10	Antígeno nuclear de proliferación celular
PD	Duplicación de la población (<i>population doubling</i>)
PDL	Curvas de nivel de duplicación de la población (<i>population doubling level curves</i>)
PDL-1	Proteína transmembrana <i>Programmed death-ligand 1</i> (CD274)
PEG	Perfil de expresión génica

p4E-BP1	<i>Translation represor protein 4E-BP1 (phosphorylated 4E-BP1)</i>
pEIF-4E	EIF-4E fosforilado (<i>phosphorylated EIF-4E</i>)
PET-TC	Tomografía por emisión de positrones-Tomografía computada
PHH3	Phospho-Histone H3 Ser10
phi	coeficientes V de contingencia de Cramer
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 4, 5-triphosphate
pMAPK	MAPK fosforilada (<i>phosphorylated MAPK</i>)
PP242	Torkinib, fármaco inhibidor de mTOR
PQC	Proteína quinasa C
RB	Proteína del Retinoblastoma
pS6	S6 fosforilado (<i>phosphorylated S6</i>)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> . Proteína fosfatasa de doble especificidad que actúa como enzima
P16	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina. Proteína supresora de tumores
P38MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno 38.
P53	Proteína supresora de tumores codificada en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13)
P70S6K	Proteína ribosomal S6 quinasa beta-1 (S6K1) también conocida como (P70-S6K).
QMT	Quimioterapia
RAF	Acrónimo de <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> . Proteína serina-treonina quinasa que participa en la vía de MAPK
RAS	Proteína G monomérica, una pequeña GTPasa, con actividad reguladora GTP-hidrolasa. Familia de protooncogenes RAS (comprende H-RAS, N-RAS, K-RAS)
RB1	Gen del retinoblastoma
RET	Receptor tirosina-quinasa de clase XIV (Receptor de la familia RET)
rho	Rangos de Spearman
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

RTQs	Receptor del factor de crecimiento tirosin-quinasa
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT-3	Proteína transductor de señal y activador de la transcripción 3. Codificada en el gen <i>STAT3</i>
S6	Proteína ribosomal S6 (ver p70S6)
S6RP	Subunidad S6 de la proteína ribosomal 40S (<i>S6 Ribosomal Protein</i>)
S-100	Proteína presente en las células derivadas de la cresta neuronal. Utilizado como marcador inmunohistoquímico
TAC	Tomografía axial computerizada
TIMP	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
TMA	Matrices de tejido (<i>Tissue micro-arrays</i>)
TNM	T (<i>tumor</i>) L (<i>lymph nodes</i>) M (<i>metastasis</i>)
TTTP	Termoterapia transpupilar
US	Ultrasonografía
USA	Estados Unidos de América
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrometro
VEFG	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (factor de crecimiento endotelial)
VCE	Vivo con enfermedad
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VSE	Vivo sin enfermedad

III. INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

1. LA ÚVEA. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA

La úvea es la capa media del globo ocular, también conocida como túnica vascular. Se divide en tres partes: el iris, el cuerpo ciliar y la coroides que a su vez dividen la úvea en anterior (iris) y posterior (cuero ciliar y coroides). (Ver figuras 1 y 2)

El tracto uveal es el encargado de nutrir la retina.

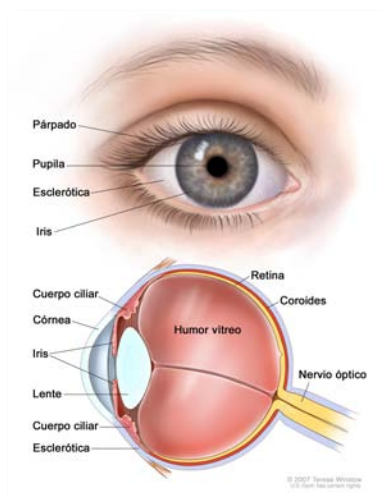


Figura 1. Anatomía del ojo.
Fuente: <https://www.cancer.gov>

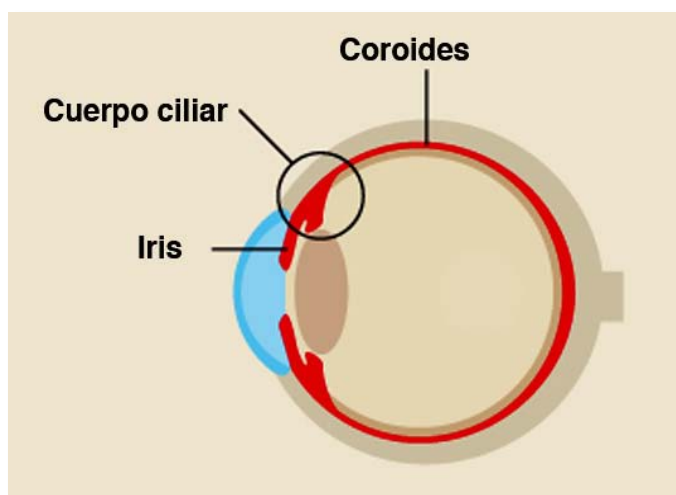


Figura 2. Esquema anatómico de la úvea. Fuente: <https://www.imo.es/es/uveitis>

1.1 Iris

El iris se encuentra localizado entre la córnea y el cristalino y en su porción posterior limita con el cuerpo ciliar. Es una estructura circular que bordea la pupila de unos 0.5 mm de grosor y 12 mm de longitud. Histológicamente el iris está formado por el epitelio pigmentario en su cara posterior, que impide el paso de luz, y a nivel anterior la capa estromal formada por tejido conectivo con una red de fibroblastos, vasos sanguíneos de pared gruesa y melanocitos, responsables del color del iris. Dependiendo de la cantidad de pigmento el iris será azul o verde (poco) o marrón (abundante). Actúa como un diafragma regulando la entrada de luz en el ojo, a través de la pupila, mediante la acción de los músculos esfínter pupilar (localizado junto al margen pupilar) y dilatador del iris (localizado en la zona intermedia), que

con su acción provocan disminución y aumento del diámetro de la pupila respectivamente. Ambos se encuentran en el estroma. (Ver figura 3).

1.2 Cuerpo Ciliar

El cuerpo ciliar, de 6 mm de longitud y forma triangular, limita externamente con la esclera e internamente con el humor vítreo. Tiene una base que se inserta en la raíz del iris, en su porción anterior, y su vértice limita posteriormente con la coroides a nivel de la *ora serrata*. Se distinguen dos zonas, la anterior constituida por prolongaciones radiales digitiformes que reciben el nombre de los procesos ciliares, y la *pars plana* que ocupa tercio medio y posterior. La superficie interna se encuentra recubierta por un epitelio de doble capa: la externa es el epitelio pigmentado ciliar que a nivel anterior se convierte en el epitelio pigmentado del iris y a nivel posterior será el epitelio pigmentado de la retina (EPR); la interna es el epitelio ciliar no pigmentado, que es una continuación de la retina neurosensorial, en él se produce el humor acuoso. En medio del grosor del cuerpo ciliar se localiza el músculo ciliar responsable de la acomodación. En el estroma, entre el epitelio y el músculo, se encuentran vasos sanguíneos así como pequeñas fibras nerviosas, melanocitos y mastocitos. (Ver figura 4).

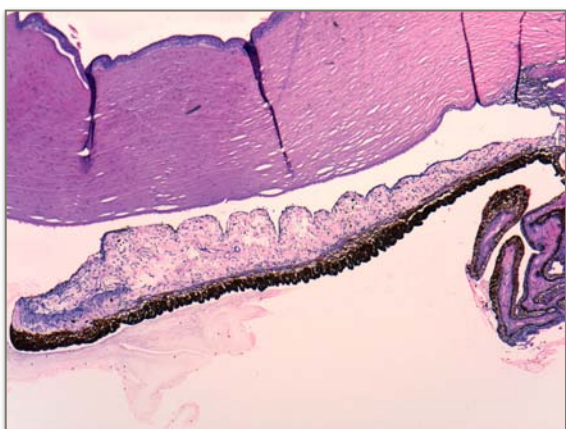


Figura 3. Histología normal del iris. HE 40x. Foto del autor,

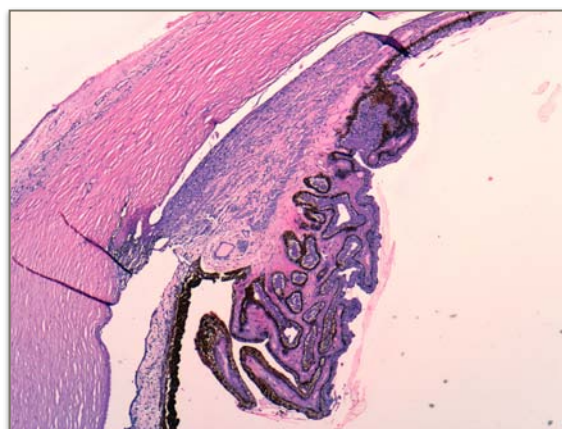


Figura 4. Histología normal del cuerpo ciliar. HE 40x. Foto del autor.

1.3 Coroides

La coroides limita anteriormente con el cuerpo ciliar y a nivel posterior con el nervio óptico. Se encuentra entre dos capas, la esclera, en su cara externa, a la que se une a través de la lámina fusca y la retina, en su cara interna, a la que se une mediante la membrana de Bruch. Tiene un grosor que va des de 0.1 mm en el polo anterior y 0.2 mm en el polo posterior.

Está compuesta por numerosas estructuras vasculares sanguíneas, que son ramificaciones de las arterias ciliares, las cuales penetran en el globo ocular alrededor del nervio óptico, que a su vez son ramificaciones de la arteria oftálmica que deriva de la arteria carótida interna. Es una capa vascular compleja con numerosas anastomosis en su zona intermedia y drena a través de las venas vorticosas que desembocan en la vena oftálmica y ésta en el seno cavernoso. Entre esta gran red vascular existen fibroblastos así como numerosos melanocitos. (Ver figuras 5 y 6).

Es un verdadero lecho vascular con función de nutrir a la retina, mantener la temperatura adecuada en el globo ocular y, gracias a la gran cantidad de pigmento melánico contenido en los melanocitos, también actúa absorbiendo los rayos de luz que no han sido absorbidos en la retina, impidiendo el paso de luz al interior.



Figura 5. Histología normal de la coroides. HE100x. Foto del autor.

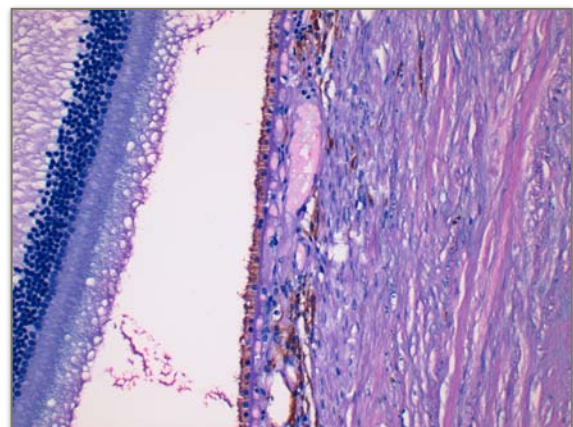


Figura 6. Histología normal de la coroides. HE 200x. Foto del autor.

2. LESIONES MELANOCÍTICAS DEL TRACTO UVEAL

2.1 Melanocitos de la úvea

El melanocito es una célula madura que elabora y contiene melanina. Según su distribución anatómica, los melanocitos pueden ser epidérmicos, meníngeos y uveales.

En el globo ocular se distinguen tres grandes zonas en donde se localizan células melanocíticas: la conjuntiva, la úvea y la retina.

2.2 Embriología

Los melanocitos de la úvea, de la conjuntiva y de la piel se originan de la cresta neural. Durante su desarrollo embriológico migraran hacia su localización definitiva. Los melanocitos uveales no empiezan a producir melanina hasta las etapas más tardías de la vida embrionaria o incluso después del nacimiento.

2.3 Lesiones melanocíticas de la úvea

Una lesión melanocítica es cualquier condición benigna o maligna que tiene origen en los melanocitos uveales (2).

Los tumores melanocíticos representan los tumores primarios más frecuentes de la úvea. Aún así, el tumor maligno más frecuente en el tracto uveal es el carcinoma metastásico siendo la mama y el pulmón los orígenes más frecuentes (1).

Peca: se caracteriza por ser un agregado de melanocitos que no alteran la arquitectura normal de la úvea. Se encuentran en el iris o en la coroides pudiendo estar presentes desde el nacimiento sin ser clínicamente aparentes hasta etapas más avanzadas de la vida.

Nevus: es un tumor benigno compuesto por melanocitos que altera la arquitectura uveal. Pueden aparecer en cualquier zona de la úvea, siendo más frecuentes en la coroides y menos en el cuerpo ciliar. Son lesiones bien circunscritas con diferentes patrones de crecimiento. Tiene un potencial de transformación maligna bajo (2).

Melanocitoma: es una variedad de nevus en donde las células névicas son grandes, poligonales, con núcleo excéntrico y abundantes melanosomas en el citoplasma, responsables de su aspecto pigmentado. Suelen ser más frecuentes en mujeres y

presentarse como lesiones nodulares, grandes, sobre-elevadas. Durante su crecimiento pueden sufrir degeneración quística así como focos de necrosis espontánea que pueden ocasionar dispersión de pigmento (5). A pesar de ser una lesión benigna, se ha descrito transformación maligna de los melanocitomas de cuerpo ciliar y coroides (2).

Melanocitosis ocular: caracterizada por una hiperpigmentación difusa de la epiesclera y del tracto uveal en la forma ocular (*melanosis oculi*) y de la piel periorbitaria en la forma oculodérmica (*melanocitosis oculodérmica o nevus de Ota*). Es una entidad de presentación unilateral y congénita, y suele ser más frecuente en mujeres.

En estos pacientes existe un riesgo aumentado de desarrollar melanoma en el tracto uveal (*melanosia oculi*) además de piel, órbita, meninges y cerebro (melanosis oculodérmica) (2).

Proliferación melanocítica uveal difusa bilateral: es una afectación simultánea, difusa y bilateral de la úvea en donde hay una marcada infiltración por melanocitos nevoides o fusiformes de aspecto benigno, pero con atípicidad cito-arquitectural, asociado a la presencia de una neoplasia visceral, (principalmente carcinomas primarios de pulmón, ovario, colon, vesícula biliar, esófago, páncreas, útero y cérvix). Se considera un síndrome paraneoplásico raro (1).

3. MELANOMA UVEAL

3.1. Epidemiología

El melanoma uveal (MU) es la neoplasia maligna primaria ocular más frecuente en el adulto, siendo excepcional en niños, con una incidencia de unos 7 casos por 1.000.000 de habitantes/año en Europa (6) y de 5.3 a 10.9 casos por 1,000,000 de habitantes y año (USA) (9). La incidencia aumenta con la edad llegando a un pico máximo de presentación entre los 60 y 70 años. Es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres y en personas de iris y piel clara. Normalmente la afectación es unilateral y raramente bilateral. La exposición solar se ha postulado como un posible factor contribuyente al desarrollo de este tumor. Mayoritariamente aparecen de forma esporádica, aunque en ciertas enfermedades se describe un

riesgo aumentado a desarrollarlo (*nevus uveal*, *xeroderma pigmentosum*, melanocitosis ocular-nevus de Ota, síndrome de nevus displásico y neurofibromatosis tipo I) (1,3)

Según su localización la incidencia es variable siendo más frecuentes en la coroides y menos en el cuerpo ciliar y en el iris (90%, 7% y 2% de los melanomas uveales respectivamente) (20).

Las cifras de mortalidad a los 5 años son variables, entre el 6 y el 53%, con independencia del tratamiento de primera línea empleado para control local de la enfermedad (8). Se sabe que aproximadamente un 50% de los pacientes van a desarrollar metástasis a distancia, principalmente en hígado, pulmón, hueso y piel (10). La supervivencia media desde su diagnóstico es de unos siete meses. En la actualidad no existe tratamiento para el melanoma uveal metastásico (MUM).

Todas estas cifras se ha mantenido estables desde los años setenta (1970) a pesar de los avances en el tratamiento y el conocimiento de la biología del tumor.

3.2 Presentación clínica, macroscopía tumoral y diagnóstico diferencial

La presentación clínica del tumor depende de su localización (ver figura 7).

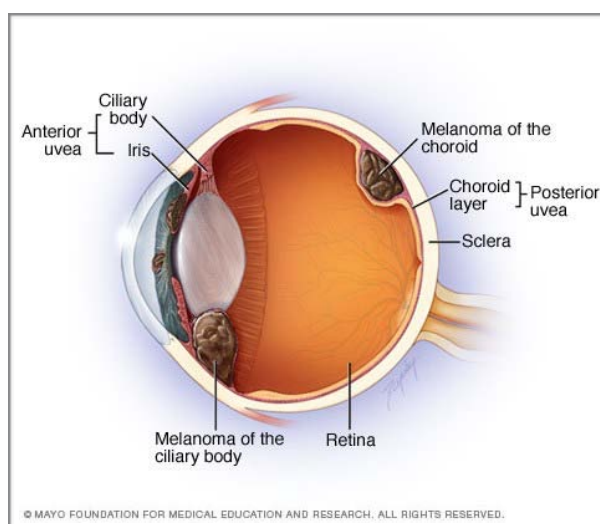


Figura 7. Esquema anatómico de la localización del melanoma en la úvea. Fuente: www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/eye-melanoma/multimedia/where-eye-melanoma-occurs/img20007551

En el **melanoma de iris** muchos pacientes cuentan una historia de lesión pigmentada que puede estar desde la infancia o presentarse en la edad adulta con una duración superior al año. Clínicamente otras lesiones circunscritas que simulan melanoma son: quistes primarios, adenomas, metástasis, cuerpo extraño, leiomioma y lesiones pigmentadas en donde se debe incluir un diagnóstico diferencial amplio: nevus, melanosis ocular, hemosiderosis ocular, atrofia esencial de iris y melanogénesis incrementada por uso tópico de agonistas de prostaglandinas (11). El principal problema en la valoración clínica de una lesión pigmentada es la distinción entre nevus y melanoma ya que no hay un punto límite en el tamaño de la misma que la pueda clasificar como benigna o maligna (11). Los signos clínicos más sugestivos de malignidad son la evidencia objetiva de que la lesión crece así como la presencia de vascularización anormal y prominente en la misma y el aumento de la presión intraocular (glaucoma). El glaucoma es un síntoma secundario en dichos tumores, bien estén circunscritos o se extiendan con afectación secundaria del ángulo de la cámara anterior.

Los melanomas de iris pueden presentar tres patrones de crecimiento: nodular, difuso y tapioca. (Ver figuras 8 y 9).

Nodular: de localización periférica, pueden tocar la córnea e infiltrar el ángulo de la cámara anterior.

Difuso: pueden presentar heterocromía del iris, corectropía, ectropion iridis y glaucoma.

Tapioca: múltiples nódulos que crecen desde la superficie del iris.

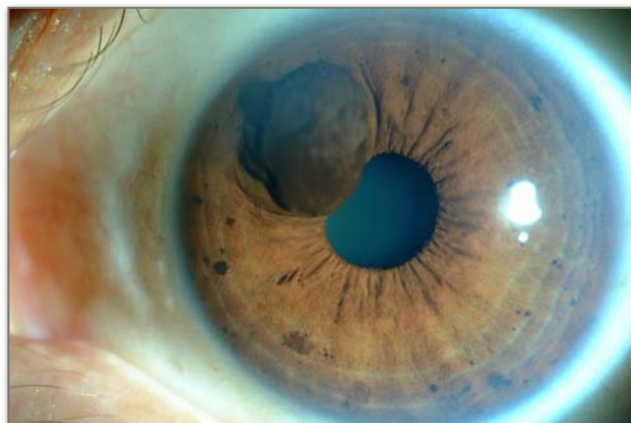


Figura 8. Imagen clínica de melanoma de iris. Cortesía Dr. J. García-Arumí.

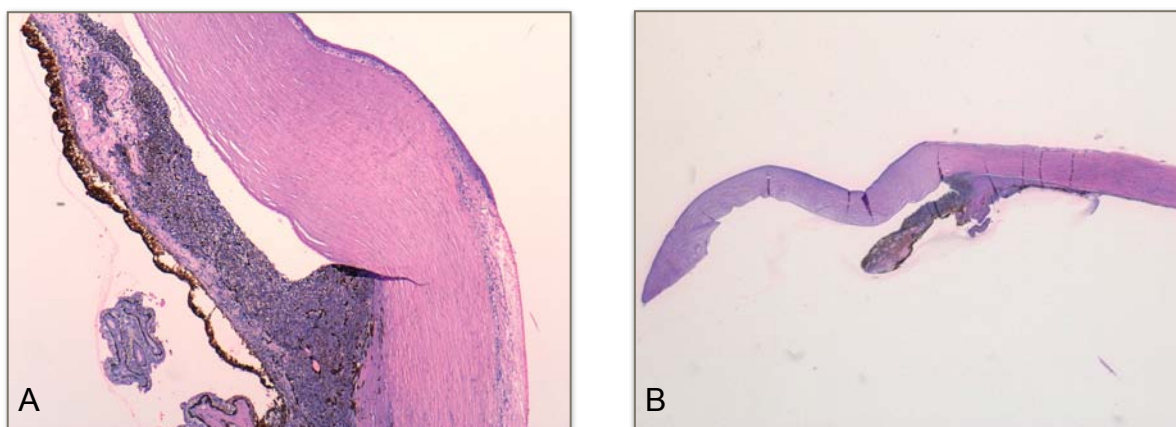


Figura 9. Histología melanoma de iris. A. HE 40x; B. macro-microfotografía. Fotos del autor.

Los pacientes con **melanoma de cuerpo ciliar** suelen permanecer asintomáticos durante mucho tiempo. Cuando el tumor da clínica, los síntomas más comúnmente descritos son: visión borrosa por astigmatismo, pérdida de visión secundaria al desplazamiento del cristalino, pérdida de un campo visual sin dolor, masa pigmentada en el ángulo de la cámara anterior, dolor por glaucoma agudo o presencia de vascularización episcleral prominente por encima de la localización del tumor. Otro signo precoz, inexplicado, es la disminución de la presión intraocular del ojo afecto en comparación al ojo sano (12).

Mediante dilatación pupilar y examen directo, si el tumor es grande, este puede verse como una masa convexa sobre-elevada, de pigmentación variable que a menudo se extiende hacia el iris o coroides (ver figura 10). Tumores de pequeño tamaño no son visibles.

El diagnóstico diferencial de los tumores del cuerpo ciliar también es amplio e incluye, además, entidades como: melanocitoma, adenoma, o raramente adenocarcinoma del epitelio pigmentado de la retina, metástasis, schwannoma, leiomioma, hemangiopericitoma, meduloepitelioma y procesos inflamatorios granulomatosos tales como sarcoidosis (13).

En los casos de **melanoma localizado en la coroides**, la presentación clínica puede ser asintomática, siendo descubiertos, en muchas ocasiones, durante una exploración ocular rutinaria. En los pacientes sintomáticos, la sensación de pérdida de visión es la presentación clínica más frecuente pero también se describe

sensación de cuerpos flotantes en el ojo, visión borrosa, fotopsia, reducción de un campo visual, tumor visible y dolor.

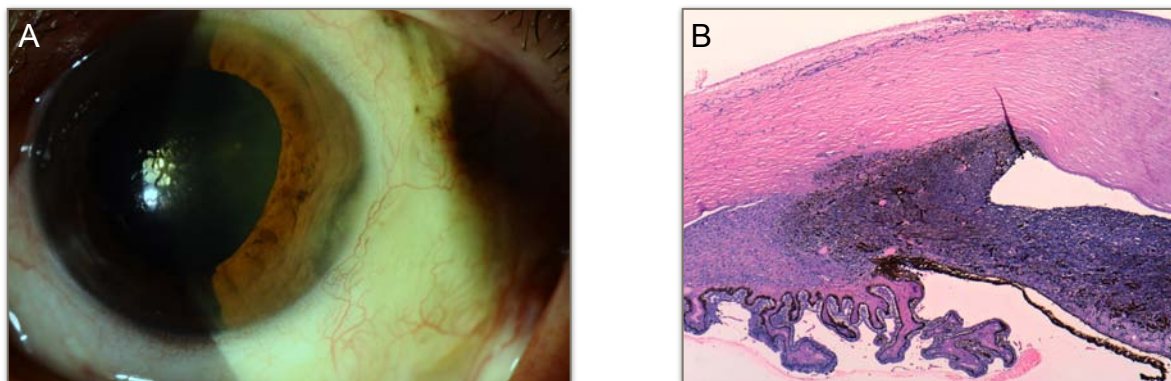


Figura 10. A. Imagen clínica de un melanoma de cuerpo ciliar con extensión a base de Iris. Cortesía del Dr. Tirso Alonso; B. Histología de invasión de cuerpo ciliar por melanoma de iris. HE 40x. Foto del autor.

El tumor suele ser único y localizado siendo las presentaciones multifocales muy raras. Según el tamaño, forma y pigmentación, la configuración macroscópica del melanoma es variable. Los tumores de crecimiento vertical suelen presentar formas discoides u ovals en fases iniciales. Al aumentar de tamaño puede infiltrar, romper la membrana de Bruch y crecer hacia el espacio subretiniano adoptando una configuración en “seta o champiñón”. Los tumores de crecimiento difuso se extienden en más del 25% del fondo ocular o de un cuadrante y su altura máxima no suele sobrepasar los 7 milímetros (1). Estos con más frecuencia presentan invasión del nervio óptico a diferencia de los de crecimiento nodular (2). (Ver figura 11, 12 y 13).

El diagnóstico diferencial principal se establece con un nevo pigmentado pero también con metástasis, hemangioma (15), melanocitoma (16), adenoma del epitelio pigmentado de la retina (17), corioretinopatía hemorrágica exudativa periférica, hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina, desprendimiento hemorrágico del epitelio pigmentario de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia del epitelio pigmentado de la retina (20).



Figura 11. Macroscopia melanoma de coroides no pigmentado. Foto del autor.



Figura 12. Macroscopia melanoma de coroides pigmentado. Foto del autor.

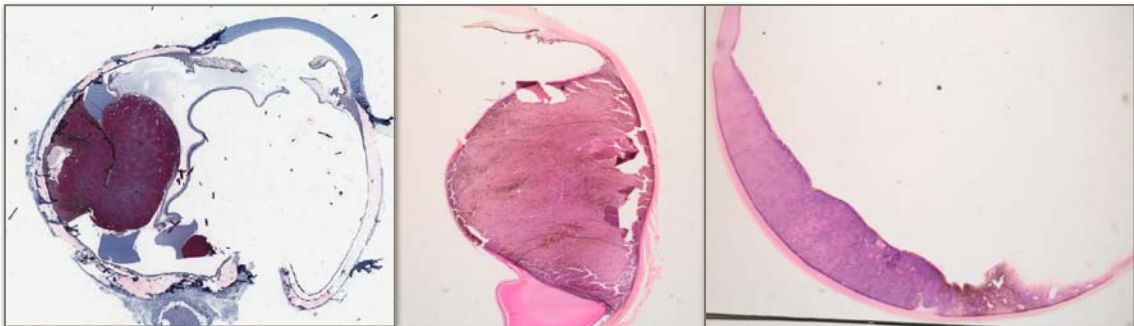


Figura 13. Histología del melanoma de coroides, tipos de patrón de crecimiento. A: en "champañón"; B: nodular; C: difuso. HE, lupa. Foto del autor.

3.3. Extensión local y metástasis

Los melanomas uveales pueden presentar invasión local hacia estructuras intraoculares adyacentes al tumor. Según su localización se pueden ver afectados el iris, el cuerpo ciliar, la retina, el vítreo, la esclera y el nervio óptico. Así mismo presentan extensión extra-ocular a través de invasión local (ej. afectación de la órbita). Las metástasis a distancia se producen solamente mediante diseminación hematogena ya que el ojo carece de linfáticos.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con melanoma uveal posterior (MUP) desarrollan enfermedad metastásica. Las metástasis pueden aparecer décadas después del tratamiento del tumor primario. Kath y colaboradores, en una serie de 24 casos con tumores primarios sin metástasis inicial al diagnóstico, observaron la aparición de metástasis entre los 2 y 250 meses después (97). Puesto que las metástasis pueden aparecer años después del diagnóstico inicial del MU, Luyten y colaboradores aconsejan incluir el HMB-45 dentro de un panel inmunohistoquímico para el diagnóstico de tumores metastásicos de origen desconocido (98).

El hígado es el órgano más frecuentemente afectado (87-95%) según las series publicadas (10, 97) y en el 40% de los casos el único (49). Otros órganos receptores de metástasis son: pulmones (24%), huesos (16%) y piel (11%) (10). La afectación de los ganglios linfáticos y el cerebro, aunque descrita, no es frecuente (10,49,97). La supervivencia media después del diagnóstico de metástasis en el hígado es de 4-6 meses, con una supervivencia al año del 10-15%. En cambio los pacientes con metástasis fuera del hígado tienen una supervivencia media de 19-28 meses y al año es del 76% (10). Estas desigualdades plantean la posibilidad de que ambos grupos presenten diferencias en la patogénesis molecular del tumor (10,98). Parece que la afectación del hígado es determinante para establecer el curso evolutivo del MUM.

En cuanto a la patogénesis de las metástasis Demichaeli y colaboradores propusieron un modelo similar al del cáncer de mama, basado en la observación de un patrón de mortalidad bimodal en los pacientes con MU sometidos a tratamiento con enucleación o braquiterapia. Según estos autores el desarrollo de las metástasis es un paso secuencial a través de diferentes fases a partir del desprendimiento de células tumorales del tumor primario que pasan primero por una fase de *latencia*

celular, en la que las células tumorales individuales no se dividen en su mayoría. Después por una fase de *latencia micrometastásica* en donde un grupo de células tumorales no pueden crecer más que el tamaño de un foco avascular ya que estas no disponen de aporte vascular, y finalmente al de *metástasis vascularizadas* que crecen hasta alcanzar la proporción de un foco tumoral. Este proceso estaría controlado por el tumor primario mediante mecanismos, no conocidos, que afectarían a la fase de latencia celular, de modo que la actuación terapéutica sobre el tumor primario podría afectarlas resultando en una aceleración del proceso de metástasis, al menos para algunos pacientes, dando lugar al primer pico de mortalidad. Para los demás pacientes, algunas de las células en estado latente seguirían el curso para la colonización de otros órganos en forma de metástasis y, en última instancia, al segundo pico de mortalidad (99).

3.4. Diagnóstico

Un oftalmólogo especializado en patología oncológica ocular puede hacer el diagnóstico de MU basado principalmente con los hallazgos de la fundoscopia y la ultrasonografía (US) (sin requerimiento de biopsia) con una exactitud del 98% (21).

El proceso de diagnóstico consta de tres partes: una anamnesis profunda, un estudio oftalmológico externo e interno y del ojo contra-lateral, para el cual el médico utilizará técnicas especializadas, y un estudio de extensión.

Para el melanoma de úvea anterior (iris), el mejor criterio diagnóstico es la evidencia de que la lesión crece. Confirmar el aumento de tamaño de una lesión melanocítica debe hacer sospechar el diagnóstico de MU. Para ello es útil el uso de fotografías seriadas, estudio de la lesión con lámpara de hendidura (biomicroscopio, microscopio óptico binocular que permite ver, detectar la posición, forma y profundidad de las lesiones, en las estructuras de la porción anterior del ojo con una amplificación entre 6 y 40 aumentos y en imágenes en tres dimensiones) y gonioscopia (lente de contacto con tres espejos que permite visualizar el ángulo iridocorneal).

Para el diagnóstico del melanoma de úvea posterior (cuerpo ciliar y coroides) la transiluminación y el examen fundoscópico a través de la dilatación pupilar (oftalmoscopia indirecta) sigue siendo los primeros pasos el proceso de diagnóstico.

Una limitación es el diagnóstico de los tumores pequeños ya que no es posible distinguir si son melanomas o nevos. Para ello son de utilidad las técnicas de imagen ocular especializadas con el fin de poder detectar signos clínicos de ayuda para su diagnóstico diferencial tales como: grosor >2mm, fluido subretiniano, sintomatología en relación a alteración de la visión, pigmentación anaranjada, tumor muy cerca del nervio óptico, la ausencia de dursas, ausencia de halo acústico en la US, ausencia de patrón con halo pigmentado, los cuales favorecen el diagnóstico de malignidad (21).

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de tumores intraoculares son (160):

- Biomicroscopía de polo anterior
- Transiluminación o diafanoscopia
- Oftalmoscopia/retinografía.
- Angiografía: con fluoresceína y con indocianina verde.
- Autofluorescencia.
- OCT (tomografía de coherencia óptica)
- Ecografía. Ecografía ocular posterior/BMU

Para el estudio de extensión, con la finalidad de valorar lesiones metastásicas, las técnicas utilizadas son: tomografía computerizada (TAC) de tórax y abdomen, PET-TAC, US y resonancia magnética abdominal (RMN) (hígado) (21). La utilidad de la detección de células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo para detectar pacientes en riesgo de metástasis está cuestionada (161). En oncología generalmente el tratamiento de tumores malignos requiere de la confirmación histológica del diagnóstico clínico. Para el melanoma intraocular, las decisiones terapéuticas se basan mayoritariamente en el diagnóstico clínico.

3.5. Histopatología

El MU está formado por melanocitos que adoptan dos tipos de morfología diferente: células fusiformes y células epitelioides. (Ver figura 14).

Células fusiformes: son cohesivas, dispuestas en haces, de morfología en forma de huso, con citoplasma finamente granular, de bordes mal delimitados y núcleo ovalado o alargado. Según las características del núcleo se dividen en dos tipos.

Tipo A: el núcleo es en forma de huso alargado y delgado. Presenta una hendidura siguiendo el eje longitudinal mayor. La cromatina es fina y homogénea y el nucléolo indistinguible.

Tipo B: el núcleo es oval, presenta un nucléolo prominente y la cromatina es granular.

Células epitelioides: son poco cohesivas, grandes, de morfología poligonal, con citoplasma abundante, eosinófilo, de márgenes bien delimitados. El núcleo es grande, redondeado, de contorno irregular, con cromatina granular, de disposición periférica y nucléolo eosinófilo prominente. Se pueden observar algunas formas pleomórficas o bizarras.

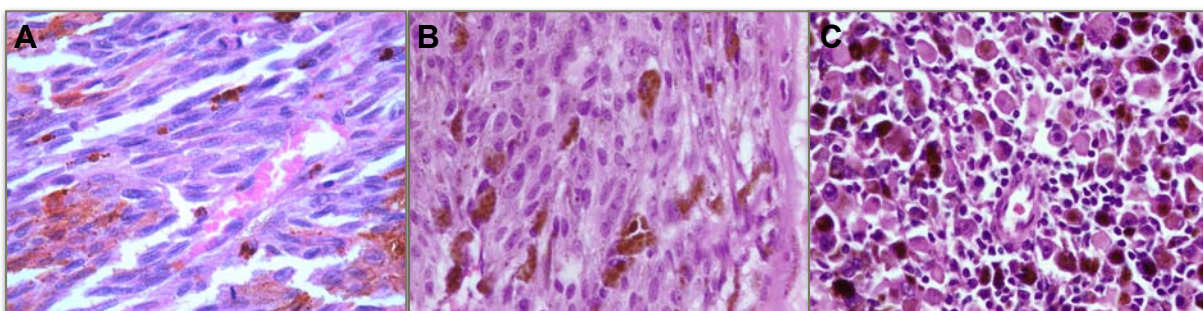


Figura 14. Tipos celulares del melanoma uveal. A: células fusiformes A; B: células fusiformes B; C: células epitelioides. HE 400x. Fotos del autor.

El tumor crece en patrón sólido formando áreas de diferente morfología, delimitadas por una trama vascular rica. Folberg y colaboradores describieron 9 patrones mediante tinción de PAS (18):

- *Normal:* el tumor crece alrededor de los vasos coroideos normales sin comprimirlos. En este caso el tumor está por debajo de la membrana de Bruch.
- *Silente:* sin evidencia de vasos tumorales.
- *Recto:* vasos rectos dispuestos aleatoriamente sin interconexiones entre ellos.
- *Paralelo:* vasos rectos dispuestos de forma paralela entre si sin ramificaciones simples dicotómicas o reticulares.
- *Paralelo con interconexiones:* los vasos paralelos se unen unos a otros adoptando un aspecto de panal de abeja estirado.

- *Arcos*: los vasos describen semicircunferencias.
- *Arcos con ramas*: vasos en forma de arco que se unen unos a otros mediante ramificaciones.
- *Bucles*: vasos formando arcos completos.
- *Redes*: Vasos en forma de arcos cerrados de disposición “back to back”.

En la mayoría de los MU se observa una distribución heterogénea de dichos patrones resultando una combinación de los mismos.

El índice de mitosis (número de mitosis por campo de gran aumento (CGA)) es mayor en las células de tipo epitelioide que en las de morfología fusiforme, así como en los tumores de gran tamaño (tumores de más de 10 mm de altura o 16 mm de diámetro basal mayor y 2mm o más de grosor/altura) (19).

El grado de pigmentación es variable y no se asocia al tipo celular (1) aunque en algunas publicaciones describen una pigmentación severa en tumores de células epitelioides y gran tamaño (19).

La presencia de necrosis tumoral también es variable a pesar de haberse objetivado en una proporción mayor en los tumores de gran tamaño. Se ha observado una mayor proporción de necrosis tumoral en los tumores grandes de tipo celular epitelioide y una correlación entre la cantidad de pigmento y porcentaje de necrosis tumoral, viendo que los tumores más pigmentados presentan mayor porcentaje de componente necrótico (19).

La presencia de infiltrado inflamatorio en el MU no es tan frecuente como en los melanomas cutáneos. Se describen dos patrones de infiltración inflamatoria, parcheada y difusa. Ésta está formada por linfocitos T y B, células plasmáticas y también macrófagos. Se ha observado una asociación entre la presencia de celularidad linfocitaria y macrófagos, en los melanomas de células epitelioides en los que el infiltrado es más severo (19).

3.5.1 Variantes citológicas

Son pocas las variantes citológicas de MU conocidas. La mayoría hacen referencia a cambios citoplasmáticos en las células melanocíticas hacia células de “aspecto claro” y entre ellas cabe distinguir entre: células balonizadas, células claras y células en anillo de sello, todas descritas en la literatura (22, 23, 24, 25).

Riley FC en 1974 y más tarde, en 1983 Mourad K. Khalil, publicaron casos de melanoma de coroides compuestos por células balonzadas. Estas se encontraban en la porción amelanótica del tumor y eran grandes, con membranas citoplasmáticas bien definidas y presencia de vacuolas intracitoplasmáticas cargadas de lípidos, de diferente tamaño, dando un aspecto “espumoso” a la célula. Los núcleos eran de diferentes medidas. Estas células balonzadas son consideradas melanocitos alterados que acumulan lípidos en su citoplasma cuyo mecanismo no está bien establecido. Para poder clasificar un tumor cómo de células balonzadas, éstas deben representar más del 50% de la celularidad tumoral. Su incidencia entre los melanomas de coroides es del 10 al 2% y son más frecuentes en los tumores de células fusiformes (23, 24).

En 1997 Hans E. Grossniklaus y colaboradores publicaron dos casos de melanoma de coroides compuestos por células con citoplasma claro, ricas en glucógeno. Se demostró su naturaleza melánica mediante técnicas inmunohistoquímicas (S-100 y HMB-45) y por microscopía electrónica. La importancia de reconocer esta entidad recae en el diagnóstico diferencial con un carcinoma metastásico de células claras (22).

Existen otras variantes citológicas más inusuales descritas en la literatura tales como melanoma con cambios oncocíticos (27), MU con diferenciación neuroendocrina (28) y MU con cambio/metaplasia lipomatosa (29).

3.5.2. Inmunohistoquímica

Los estudios con inmunohistoquímica son, en la actualidad, una herramienta muy útil, y a veces imprescindible, que utiliza el patólogo en el diagnóstico diferencial de los distintos tumores existentes en el cuerpo humano.

Las células del MU así como los demás tejidos derivados del neuroepitelio y de la cresta neural expresan la proteína S-100. Éste es un marcador altamente sensible pero poco específico. También pueden expresar enolasa neuronal específica (NSE) a pesar de ser más específica para tejidos con diferenciación neural. En 1991 Burnier y colaboradores estudiaron la expresión de estos dos marcadores junto a la de HMB-45 en una serie de 33 lesiones melanocíticas uveales (13 nevos y 20 melanomas). Concluyeron que la expresión de HMB-45 era más específica que la de

S-100 y NSE para el diagnóstico diferencial entre tumores melanocíticos y no melanocíticos pero no servía para distinguir entre melanomas y nevos uveales (30).

El Melan-A, considerado un marcador específico para las células melanocíticas ya que es un antígeno producto del gen MART-1, y la Tirosinasa, enzima relacionado con la síntesis de melanina en los melanocitos y las células del melanoma, se expresan en los melanocitos uveales normales y también el MU con independencia del tipo celular. Su expresión no se ve artefactuada pese a tratamientos con radiación (31).

Es ampliamente aceptado que los MU expresan vimentina por ser el tipo de filamento predominante en los melanomas malignos, tanto uveales como cutáneos (32). A pesar de no ser bien conocido, en la literatura está reportada la expresión de citoqueratinas (CK) en los melanomas. En 1992 Ulrich Fuchs publicó un estudio con un grupo de 52 pacientes con MU primario y metastásico, tratados con enucleación, en los que se determinó la frecuencia de inmunoreacción con CK. En ambos tumores, primarios y metástasis, se estudió cuales CK se expresaban y si dicha expresión tenía un valor pronóstico. Las conclusiones del estudio fueron que las CK 8 y 18 eran las que principalmente se expresaban en los MU. Cuando en el tumor primario se observó expresión de CK, las metástasis eran más frecuentes. Ésta tendencia se explicaba también, por la mayor presencia de células epitelioides en ellos, que con más frecuencia aparecían inmunoreactivas a las CK. Por lo tanto no se pudo demostrar que la expresión de CK en los MU fuera un factor pronóstico independiente (33).

Las células de los melanomas uveales, no expresan de forma idéntica los mismos marcadores que las de los melanomas cutáneos (34).

3.5.3. Clasificación del Melanoma Uveal

Existen dos clasificaciones para el MU, las dos con repercusión pronóstica.

La Clasificación de Callender modificada clasifica el MU en tres grupos según el tipo de células que lo forman. La clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) se basa en el estadiaje TNM, T (tumor), N (nodos-ganglios linfáticos) y M (metástasis). Actualmente está en la octava edición publicada en 2017.

3.5.3.1. Callender y Callender Modificada

En 1931 Callender clasificó el MU en base a su composición celular. En esta clasificación se propusieron 6 categorías: melanomas compuestos por células fusiformes siendo la mayoría de tipo A, los compuestos por células fusiformes siendo la mayoría tipo B, los compuestos por células fusiformes dispuestas en patrón fascicular, formando haces o fascículos (parecido al que observamos en el schwannoma), los de tipo mixto compuestos por la combinación de células fusiformes y epitelioides, melanomas constituidos enteramente por células epitelioides y finalmente los necróticos, que por su gran porcentaje de necrosis no eran clasificables. El mismo autor y otros pudieron demostrar su valor pronóstico ya que se constató que los tumores compuestos de células fusiformes A, B y los fasciculares tenían mejor pronóstico en relación a los MU de las demás categorías (35,36, 37) .

La clasificación de Callender también fue criticada debido a que no aporta criterios histológicos para el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma de células fusiformes A y por su poca reproducibilidad, ya que no existen criterios citológicos objetivos para diferenciar cada una de las categorías. La morfología de las células del MU abarca un gran abanico de formas en donde algunas pueden compartir características de las que Callender definía para sus diferentes categorías (ej: célula fusiforme con núcleo ovalado, típico de fusiforme B, y con nucléolo eosinófilo grande, típico de epitelioides) (38).

McLean y colaboradores modificaron la clasificación de Callender y propusieron 3 categorías nuevas (tipo celular fusiforme, tipo celular epitelioides y tipo celular mixto) fijándose en las características morfológicas del núcleo y nucléolo, así como en la relación entre el tipo celular y la supervivencia (38):

Fusiformes: células ahusadas (descripción en el apartado 3.5) que se disponen en un patrón compacto y cohesivo rodeado por una densa trama de reticulina (ver figura 15).

Epitelioides: (descripción en el apartado 3.5) en esta nueva clasificación los autores incluyen las células epitelioides grandes y pleomórficas así como las de menor tamaño y morfología más homogénea (ver figura 16). Crecen en un patrón poco cohesivo sin rodearse de la trama de reticulina.

Mixtos: tumores compuestos por una mezcla de los dos tipos celulares anteriores, células fusiformes y epitelioides.

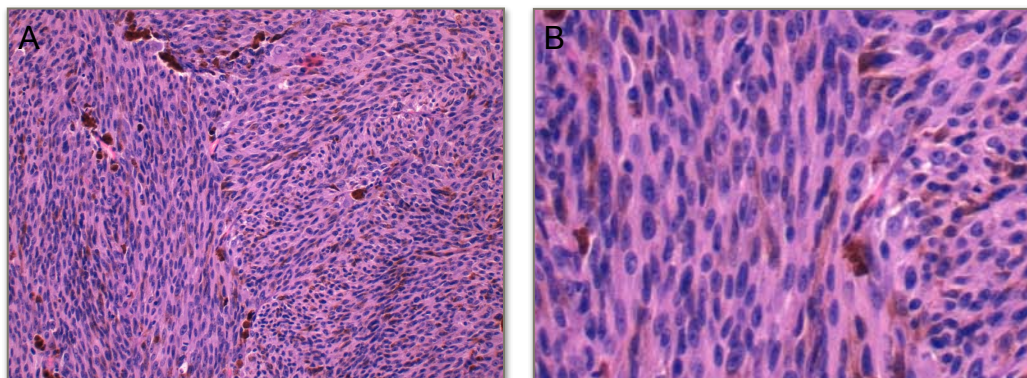


Figura 15. A y B. MU de tipo fusiforme. Patrón fascicular compacto y cohesivo, HE. Foto del autor.

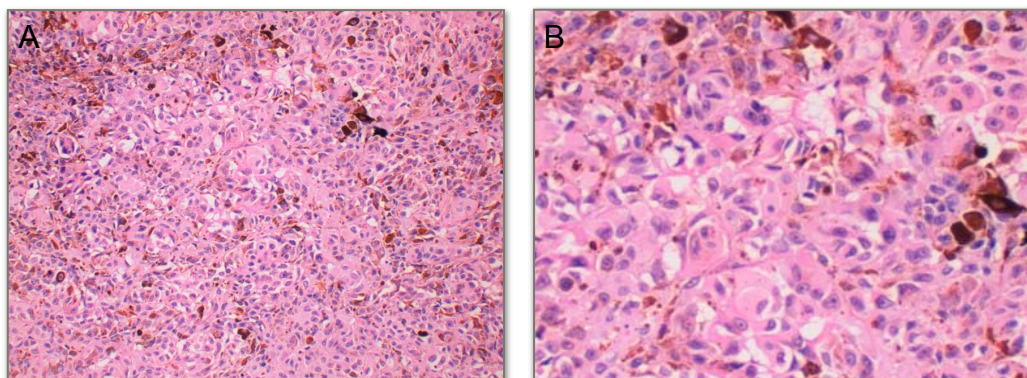


Figura 16. A y B. MU tipo epitelioide. Patrón poco cohesivo, HE. Foto del autor.

3.5.3.2. American Joint Committee on Cancer (AJCC)

La clasificación de la AJCC utiliza el estadiaje TNM, de uso universal. Proporciona un lenguaje médico-científico que permite definir el estatus local, regional y metastásico de un paciente con cáncer en un momento concreto. Se utiliza para predecir el pronóstico inicial y la toma de decisiones terapéuticas.

En el campo de la oncología ocular su aplicación se ha visto incrementada y ha contribuido a la mejora del manejo y cuidado del paciente así como para evitar la

pérdida de visión y aumentar la supervivencia. Se ha diseñado tanto para melanomas de úvea anterior (iris) como para MUP (cuerpo ciliar y coroides).

Para los MUP, la clasificación incluye categorización y estadiaje. La categorización se refiere a la clasificación del tumor en 4 grupos T1, T2, T3, y T4, en base al tamaño tumoral medido con el grosor y el diámetro basal del mismo (Tabla 1 i 2).

El estadiaje es el resultado de valorar conjuntamente la categorización (T), la información del estado de los ganglios linfáticos (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M) para encuadrarlo en uno de los cuatro estadios denominados estadios I, II, III y IV. (39, 40) (Tabla 3). Lo que consigue esta clasificación es estratificar el MU mediante un estadiaje anatómico que ha demostrado tener valor pronóstico para enfermedad metastásica y supervivencia (40, 41). Actualmente este sistema de estadiaje es una herramienta indispensable para los especialistas en oncología ocular.

Tabla 1: AJCC Clasificación del melanoma uveal (primario de coroides y cuerpo ciliar). Categoría T (tumor) definida como diámetro basal y grosor del tumor.

Grosor (mm)	Diámetro basal mayor (mm)						
>15	4	4	4	4	4	4	4
12.1-15	3	3	3	3	3	4	4
9.1-12	3	3	3	3	3	3	4
6.1-9	2	2	2	2	3	3	4
3.1-6	1	1	1	2	2	3	4
</=3	1	1	1	1	2	2	4
	</=3	3.1-6	6.1-9	9.1-12	12.1-15	15.1-18	>18

Tabla 2: Subclasificaciones de la categoría T (tumor) definidas según la extensión anatómica del tumor basado en la afectación del cuerpo ciliar y/o extraescleral (AJCC).

Tx	Extensión anatómica
Ta	Sin afectación del cuerpo ciliar y sin extensión extraescleral
Tb	Con afectación del cuerpo ciliar pero sin extensión extraescleral
Tc	Sin afectación del cuerpo ciliar pero con extensión extraescleral \leq a 5mm
Td	Con afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraescleral \leq a 5mm
T4e	Cualquier tamaño del tumor (T) con extensión extraescleral $>$ a 5mm en diámetro

Tabla 3: Estadaje anatómico del MU definido por las categorías de tumor, ganglios linfáticos y metástasis (AJCC).

Estadio	Clase T	Afectación ganglionar	Metástasis a distancia
I	T1a	N0	M0
IIa	T1b-d, T2a	N0	M0
IIb	T2b, T3a	N0	M0
IIIA	T2c-d, T3b-c, T4a	N0	M0
IIIB	T3d, T4b-c	N0	M0
IIIC	T4d-e	N0	M0
IV	Cualquier T Cualquier T	N1 Cualquier N	M0 M1a-c

3.6. Tratamiento

En la actualidad el manejo del MUP depende de varios factores tales como: tamaño del tumor, extensión, edad del paciente, estado general de salud, estado del ojo contralateral, deseo del paciente y estado psicológico del mismo. Además, la elección del tratamiento debe basarse en los datos científicos publicados.

En la mayoría de centros de salud con especialistas en oncología ocular, las opciones terapéuticas para control local de la enfermedad incluyen la radioterapia, la enucleación, termoterapia transpupilar (TTTP), resección local y observación periódica.

El control sistémico de la enfermedad hace referencia a aquellos tratamientos para la enfermedad metastásica establecida, entre los que se ofrecen la quimioterapia (QMT), la inmunoterapia y la radioterapia, y para la prevención de la misma, especialmente en aquellos pacientes altamente susceptibles a padecerla (en base a los resultados de los tests genéticos) (42).

En el futuro el manejo del MUP va en el camino de ser una combinación de tratamientos locales y sistémicos dirigidos a “dianas terapéuticas”, que se ofrecerán al paciente de forma individualizada en función de su pronóstico, en base a la detección de alteraciones moleculares y citogenéticas que conducen al desarrollo del tumor y de la enfermedad metastásica diseminada.

3.6.1. Control local de la neoplasia primaria

Radioterapia: es un tratamiento efectivo para el control local de la enfermedad así como para la preservación del ojo y la visión en la mayoría de los pacientes (88). Es el más utilizado en la actualidad. La mayoría de centros utilizan una placa de radioterapia (braquiterapia) y muchos utilizan iones de helio o haz de protones. Algunos centros lo combinan con TTTP y tratamientos para minimizar las complicaciones vasculares de la irradiación. Las indicaciones recogidas en la guía de consenso de la Sociedad Americana de Braquiterapia son: melanomas de iris, cuerpo ciliar, coroides, subfoveales, yuxtapapilares, circumpapilares, tumores de pequeño y gran tamaño así como los que presentan extensión extraescleral limitada. En las contraindicaciones se incluyen tumores con gran extensión extraocular (T4e o >5 mm), ojo ciego doloroso, y aquellos sin percepción visual de la luz (43).

Enucleación: es la segunda modalidad de tratamiento más utilizada en la actualidad. Especialmente indicada en tumores grandes (>18 mm de diámetro y >10 o 12 mm de grosor), tumores con moderada extensión extraescleral y tumores que rodean el nervio óptico.

Resección local: técnica referida a la exéresis del tumor. Indicada en casos seleccionados de melanoma de iris y de cuerpo ciliar. Esta técnica permite extraer el tumor, su estudio histológico, la preservación del globo ocular así como de la visión y evitar los daños colaterales de la irradiación. Los inconvenientes de la técnica son su dificultad quirúrgica, motivo por el cual se practica en muy pocos centros especializados.

Termoterapia transpupilar: es un tratamiento alternativo para los melanomas de coroides pequeños que se encuentran localizados en la región paramacular y extrapapilar (no están en la fovea o no tocan el disco óptico). Ha desplazado a la fotocoagulación con láser de argón.

Resección interna: utiliza métodos como la vitrectomía y se aspira el tumor en pequeños fragmentos. Técnica controvertida por su potencial riesgo macro y microscópico de extensión tumoral. García-Arumí ha presentado varias publicaciones en las que evalúa la seguridad y la eficacia del tratamiento de melanomas coroides posteriores mediante *endoresección* concluyendo que los pacientes tratados con esta técnica presentan un riesgo de metástasis, muerte o recurrencia local similar al que presentan los pacientes, con semejantes tumores, tratados mediante otras técnicas (163, 164, 165).

Exanteración orbitaria: raramente utilizada pero indicada en los casos de enfermedad avanzada con extensión extraescleral orbitaria.

Observación: puede ser el manejo de elección en pacientes añosos, médicamente inestables, con enfermedad maligna no ocular avanzada, y en los casos con pérdida de visión en un ojo y presencia de melanoma de pequeño-mediano tamaño en el otro.

Test genético (citogenético, fish Cr3 y Cr8): además del tratamiento indicado se ofrece la realización de este test con finalidades pronósticas. Se puede realizar sobre material de punción aspiración en los pacientes que se someten a tratamiento con radioterapia y con corte histológico en los pacientes sometidos a exéresis tumoral. Si el resultado implica que el paciente tiene alto riesgo de desarrollar metástasis a distancia se le puede ofrecer un tratamiento sistémico, si por el contrario el riesgo es bajo la actitud es conservadora con controles periódicos.

3.6.2. Control sistémico de la neoplasia diseminada

Existen distintas opciones terapéuticas para el MUM entre las que se incluyen la cirugía (resección de la metástasis), QMT sistémica, QMT intraarterial, quimioembolización y QMT asociada a inmunoterapia.

Los tratamientos con cirugía son una opción para aquellos pacientes que presentan

una metástasis solitaria resecable (91). Ésta y la QMT sistémica no han demostrado ofrecer ningún o muy pocos resultados para mejorar la supervivencia de los pacientes.

La Dacarbacina ha sido el quimioterápico inicialmente utilizado para el tratamiento farmacológico sistémico y el único que todavía está aprobado para ello (90). Es un miembro de la clase de los agentes citostáticos alquilantes que destruye las células neoplásicas mediante la adición de un grupo alcalil a su ADN lo que permite la formación de puentes intra o intercatenarios que producen una alteración funcional del ADN y la muerte celular. Por lo tanto, este fármaco inhibe la multiplicación celular actuando como un agente citostático. Otros quimioterápicos utilizados han sido fotemustine y gemcitabine/treosulfan. Con la combinación de múltiples fármacos incluyendo la dacarbacina en un régimen de QMT, se han conseguido tasas de respuesta del 35 al 45% pero a expensas de provocar una alta toxicidad y sin un impacto en la supervivencia de los pacientes (92).

La QMT intraarterial ha sido la mejor opción terapéutica cuando las metástasis se han localizado en el hígado (92). Efectos esperanzadores se han obtenido con el uso intraarterial de fotemustine (respuestas del 40% en MUM) (89).

La quimioinmunoterapia con régimen de 4 drogas, bleomicina, vincristina, lomustina y dacarbacina (BOLD) e interferón alfa (respuestas entorno al 20%) se ha propuesto para aquellos pacientes con metástasis extrahepáticas y como tratamiento de segunda línea (91).

En la última década se ha avanzado en el conocimiento de la genética molecular así como de las vías de señalización implicadas en la patogénesis del MUM lo cual ha abierto nuevas líneas de investigación en inmunoterapia, agentes antiangiogénicos y en dirección a desarrollar terapias dirigidas a moléculas “diana”. Mientras que el Ipilimumab ha demostrado ser efectivo para el melanoma cutáneo metastásico, no parece ser mejor que los regímenes de QMT sistémica para MUM. Tampoco se han alcanzado respuestas en la supervivencia de los pacientes afectos de MUM con agentes antiangiogénicos (VEFG) ni han demostrado ninguna respuesta los inhibidores de las tirosin-quinasa (sorafenib, sunitinib e imatinib) (93).

Se sabe que las mutaciones de *GNAQ/GNA11*, presentes en el 80% de los MUM, producen una activación aberrante de la vía de señalización de MAPK. En esta línea

se están estudiando tratamientos con inhibidores de MEK tales como selumetinib (AZD6244), que es un inhibidor dual de MEK1/2. Aún así, los últimos resultados publicados de un ensayo clínico randomizado en fase II que intenta evaluar selumetinib versus temozolomida (agente QMT) en pacientes con MU avanzado y mutaciones para *GNAQ/11*, no han demostrado una mejora en la supervivencia a pesar de obtener una modesta mejora en la supervivencia libre de progresión y las tasas de respuesta (94).

Abdel-Rahman MH, y colaboradores, publicaron que el descenso en la expresión de PTEN estaba presente en el 60% de MU primario de curso agresivo en comparación a los de evolución menos agresiva (95). Por lo tanto las moléculas efectoras de la vía de PI3K, como mTOR, han sido consideradas moléculas principales y buenas opciones como dianas terapéuticas. Aún así, en algunas líneas celulares de MU, cuando se inhibe la vía de mTOR con rapamicina, sólo se inhibe el 9-21% de la proliferación celular de las mismas (96).

Se sabe que la expresión génica se encuentra regulada por la acetilación y desacetilación de las histonas (moléculas que rodean el ADN). En el MU se ha observado que los inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) pueden producir una diferenciación de las células de MU y la entrada en estado de “dormancy” o latencia de la enfermedad micrometastásica. Por ello los inhibidores de la HDAC prometen tener aplicaciones en la terapia adyuvante más que para la enfermedad diseminada avanzada (90).

Estos tratamientos sistémicos podrían ser más efectivos como tratamiento adyuvante más que para tratar los implantes metastáticos macroscópicos en donde múltiples mecanismos de resistencia podrían contribuir al fracaso de su beneficio (90).

3.7. Factores Pronósticos

El potencial maligno de los tumores es lo que durante años ha preocupado, y sigue preocupando a los médicos, para poder entender el porqué algunos de sus pacientes evolucionan de forma más tórpida y rápida que otros a pesar de tener el mismo tipo de neoplasia. Por este motivo dirigen sus esfuerzos en poder reconocer

factores, intrínsecos al tumor o del propio paciente, que permitan clasificar y/o predecir la evolución del curso de su enfermedad (factores pronósticos) para poder ofrecer tratamientos más eficaces o incluso preventivos.

El MU no ha sido una excepción y desde que se conoce este tumor hasta la actualidad, se han descrito varios factores clínicos, histopatológicos, citogenéticos y moleculares que permiten identificar aquellos pacientes que presentan un mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia y que probablemente se podrían beneficiar de un tratamiento profiláctico y/o adyuvante adecuado.

A continuación se exponen todos los factores pronósticos que se han descrito en el MU según una revisión exhaustiva de la literatura.

3.7.1. Clínicos

Son aquellos que derivan del paciente y que se obtienen de la anamnesis y exploración del mismo.

Los factores clínicos con valor pronóstico son: la edad en el momento del diagnóstico, sexo, tamaño tumoral, localización del tumor, configuración o patrón de crecimiento, asociación con melanocitosis ocular u oculodérmica, extensión tumoral extraocular y estadiaje según la clasificación de la AJCC (46).

3.7.1.1. Edad y sexo

La edad de presentación avanzada es un factor de mal pronóstico. Shields y colaboradores relacionaron la edad de presentación, por décadas, de 8033 pacientes con MU y el riesgo de aparición de metástasis y vieron que había un incremento gradual del riesgo de metástasis con el aumento de años (10% de riesgo de metástasis entre los 11-20 años, 21% entre los 41-50 y 30% entre los 71-80) (47). También el grupo Europeo de Oncología Oftálmica, en un estudio realizado sobre 299 pacientes, entre ellos 114 niños (2,7-17,9 años) y 185 adultos jóvenes (18-25 años) afectados de melanoma de coroides y cuerpo ciliar, confirmó que los niños tenían mejor pronóstico que los adultos jóvenes (56).

A pesar de haber estudios que no han encontrado asociación entre el sexo del paciente y el riesgo de metástasis o muerte debido al MU, algunos otros sí lo han demostrado. Zolo y colaboradores observaron que los hombres presentaban un

mayor riesgo de metástasis y muerte que las mujeres en un estudio con 723 pacientes afectados de MU y que la mortalidad en los primeros 10 años era 2 veces superior en los hombres (48). El mismo autor sugirió que este riesgo menor en las mujeres podría ser debido a efectos hormonales y que los estrógenos tendrían un papel inhibitor en el crecimiento de micrometástasis en el hígado (50).

3.7.1.2. Localización y configuración del tumor

Según la localización del MU, el riesgo de metástasis a los 10 años es diferente, el 7% en los que asientan en el iris, el 33% en los originados en el cuerpo ciliar y el 25% para los de coroides (44). El melanoma de iris es el que tiene mejor pronóstico. Parece que el bajo riesgo de metástasis para los melanomas en esta localización está relacionado con un tamaño tumoral menor o una baja actividad biológica del mismo (44). El melanoma de cuerpo ciliar es el que tiene peor pronóstico. Según Li y colaboradores existe una asociación entre el grado de afectación del cuerpo ciliar y el desarrollo de metástasis relacionadas con MU. De acuerdo con su estudio, un melanoma de origen en el cuerpo ciliar con afectación de su totalidad tiene 3,6 veces más de riesgo de metástasis que el que afecta en >50% de la base tumoral en el cuerpo ciliar que tiene de 1,6-2,3 veces más de riesgo respecto a uno de origen coroidal (51).

Los melanomas con patrón de crecimiento difuso son muy infrecuentes (11% de los melanomas de iris, <1% de los de cuerpo ciliar y 3-17% de los de coroides). Para todas las localizaciones de la úvea, los melanomas con patrón de crecimiento difuso tienen peor pronóstico (52, 53, 54). Parece que en el iris estaría asociado a una elevada presencia de células epitelioides, un aumento de la presión intraocular, extensión del margen posterior hacia el ángulo y extensión extraocular (52). En cuanto a los melanomas de cuerpo ciliar en anillo, la dificultad del diagnóstico y por consiguiente el retraso en diagnosticarlos y tratarlos sería el principal motivo (53). Referente a los melanomas difusos de coroides, el pronóstico también estaría relacionado con la dificultad y el retraso en el diagnóstico pero también por una mayor proporción de células epitelioides y mayor tendencia a la extensión extraocular (54).

3.7.1.3. Tamaño tumoral y estadiaje (AJCC)

Los MUP se clasifican en tres categorías dependiendo del tamaño, en base al grosor del tumor: *pequeños* (≤ 3 mm), *medianos* ($<3-8$ mm) y *grandes* (>8 mm) y el pronóstico de relaciona directamente con el tamaño tumoral. La mortalidad a los 10 años es de 12% para melanomas pequeños, del 26% para los medianos y del 49% para los grandes (44). En el mismo estudio Shields CL y colaboradores también observaron que, por cada milímetro de grosor añadido, se incrementa un 5% el riesgo de desarrollar metástasis a distancia.

La misma autora demostró el valor pronóstico de la clasificación del AJCC para MUP, solamente en la categoría tumoral de tamaño (T), en un estudio retrospectivo con una muestra de 7731 pacientes en el que concluyó que comparando con los MUP clasificados como T1, en la categoría T2 la tasa de metástasis y muerte era 2 veces mayor, en la categoría T3 era 4 veces mayor y en la categoría T4 era 8 veces mayor (45).

El valor pronóstico del estadiaje según la clasificación de la AJCC ha sido validado en varios estudios (40, 41) (ver apartado 3.5.3.1). La presencia de extensión extra-escleral queda recogida en esta clasificación en los estadios avanzados (III y IV) los cuales ha quedado demostrado que tienen peor pronóstico. (Ver figura 17).

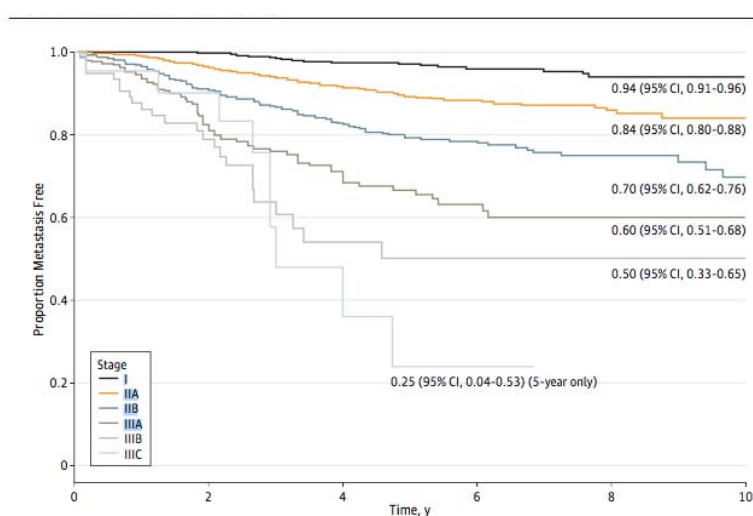


Figura 17. Curvas de Kaplan Meyer para supervivencia libre de metástasis en una muestra de 3217 pacientes estadiados según la clasificación de la AJCC (41).

3.7.1.4. Asociación con melanocitosis ocular u oculodérmica

La melanocitosis ocular u oculodérmica es una condición que predispone a MU. En 2013 Shields CL y colaboradores publicaron un estudio en donde estudiaron la asociación entre melanocitosis ocular/oculodérmica y la incidencia de metástasis de MU en una serie de 7872 ojos. Los resultados de este estudio fueron que los pacientes con MU asociados a melanosis ocular/oculodérmica tenían un riesgo de desarrollar metástasis dos veces mayor en comparación a los que no presentaban esta afectación (55).

3.7.2. Histológicos

Son aquellos que se derivan del estudio del tejido tumoral. Los factores histológicos con implicación pronóstica son: tipo celular, actividad mitótica, diámetro medio nuclear, patrón vascular, patrón de matriz extra-vascular, infiltrado inflamatorio, expresión de IGF-1R y expresión de HLA de Clase I (46).

3.7.2.1. Tipo celular y tamaño nuclear

El tipo celular del MU está relacionado con el pronóstico (ver apartado 3.5.3.1). Pacientes con tumores compuestos exclusivamente con células fusiformes tienen un pronóstico más favorable que aquellos con componente de células epitelioideas (tipo mixto o epitelioide puro) que tienen peor pronóstico (38).

La medida del diámetro medio de diez nucléolos (DMN) se asocia al pronóstico. A mayor diámetro nucleolar peor pronóstico (72). En un estudio de 167 muestras de MU en ojos enucleados Al-Jamal Rt y colaboradores observaron una supervivencia a 10 años del 74% en los pacientes cuyos tumores presentaban un DMN pequeño, del 60% para los de tamaño intermedio y del 42% en los de mayor tamaño (mediana de DMN: 4.05 μm) (73).

Coleman y colaboradores no pudieron demostrar la relación pronóstica para DMN con un valor significativo pero sí para la derivación estándar del área nuclear y nucleolar en un estudio en donde se relacionaban las características morfométricas de la celularidad del MU según la clasificación de Callender y el pronóstico (75).

Rana'a T y colaboradores en 2010 estudiaron el valor predictivo pronóstico del DMN en las metástasis de MU y concluyeron que no es un buen marcador de supervivencia después del diagnóstico de metástasis hepáticas (76).

3.7.2.2. Actividad mitótica

El número de mitosis que presenta un tumor indica la actividad proliferativa del mismo y los tumores con un alto índice de proliferación suelen tener peor pronóstico. Esto también se cumple en el MU de forma que tumores con mayor número de mitosis presentan un mayor riesgo de mortalidad (57, 58, 59).

El índice mitótico se establece contando el número de mitosis por 40 CGA (definiendo como CGA el área que se visualiza al microscopio óptico mediante el objetivo de 40x), en una sección teñida con hematoxilina-eosina.

Para mejorar la eficiencia y reproducibilidad del conteo de mitosis, se ha propuesto la evaluación de las figuras de mitosis mediante técnicas de inmunohistoquímica con distintos anticuerpos, PHH3 (59), PC-10 (60), MIB-1 (Ki-67) (61, 62, 74), demostrando ser técnicas sensibles y reproducibles útiles y que se pueden procesar en preparaciones histológicas convencionales.

3.7.2.3. Patrón y densidad vascular

La neovascularización tumoral es un factor fundamental en el desarrollo y crecimiento de los tumores y su tendencia a metastatizar. En el caso del MU es de gran importancia ya que su vía de diseminación es exclusivamente hematógena debido a que el ojo carece de sistema de drenaje linfático.

Los esfuerzos destinados a confirmar la implicación pronóstica de la microcirculación recaen en el hecho de que el MU es de los pocos tumores que se tratan sin confirmación histológica y en el que la visualización de la trama vascular podría realizarse mediante técnicas de imagen no invasivas que a su vez estarían introduciendo una información pronóstica para el tratamiento y evolución del paciente (67, 68, 69).

Folberg y colaboradores introdujeron la idea de la existencia de patrones microvasculares en el MU observado una relación entre el patrón morfológico vascular y la supervivencia, sugiriendo que los diferentes patrones vasculares son reflejo de la progresión tumoral, concepto en la línea de las descripciones para angiogénesis tumoral realizadas sobre otras neoplasias (18, 64). El patrón normal se asocia a un pronóstico favorable mientras que los patrones de paralelo con interconexiones, bucles y redes (ver apartado 3.5) son los que presentan peor pronóstico (65, 70, 71).

A pesar de haber estudios en los que no quedó demostrada una asociación entre el pronóstico y la densidad de vasos que se observan en un MU (63), otros han probado que una densidad micro-vascular elevada se asocia a una supervivencia menor y, a su vez, a patrones vasculares en bucles y redes, celularidad epitelioide y a tumores con diámetro basal mayor, todos ellos considerados factores de mal pronóstico (66).

3.7.2.4. Infiltrado inflamatorio

El infiltrado inflamatorio, formado por un grupo heterogéneo de células, juega un papel principal en el desarrollo y progresión de muchas neoplasias malignas. En el MU se puede observar celularidad inflamatoria acompañante en un 12% de los casos (77, 79). Éste se compone de linfocitos y macrófagos. El componente linfocitario infiltrativo tumoral (LIT) está constituido mayoritariamente por linfocitos T citotóxicos (CD8+), escasos linfocitos T helper (CD4+), linfocitos T reguladores (Foxp3+) y algunos linfocitos B, sin linfocitos natural killer (79, 80, 83). En el componente macrofágico asociado al tumor (MAT) se identifican dos tipos de macrófagos: los tipo-M2, más frecuentes, que expresan CD68 y CD163 y tienen una función pro-angiogénica y anti-inflamatoria, y con menor proporción los tipo-M1, que no expresan CD163 y su función es activadora de la respuesta inmune y antiangiogénica (80, 82, 83).

La presencia de infiltrado inflamatorio, tanto LIT como MAT, se asocia a una peor supervivencia (77, 78, 79, 80, 81, 82).

En un estudio con 1193 casos de MU, Cruz y colaboradores demostraron que los tumores con densidad linfocitaria mayor (>100 linfocitos/20 CGA) presentaban una supervivencia a los 15 años del 37% en comparación al grupo de densidad linfocitaria menor que tenían una supervivencia del 70% (77). La presencia de LIT también se ha asociado a monosomía del cromosoma (Cr) 3 que a su vez también es factor de mal pronóstico (84).

En un estudio con 43 MU se observó que niveles bajos de macrófagos de fenotipo M2 se asociaba significativamente con una mejor supervivencia (85).

Los MU que tienen delección del Cr 3 pueden producir mediadores de la inflamación que a su vez activan y reclutan células del grupo LIT y MAT resultando en la producción de más mediadores de la inflamación que consiguen generar un

microambiente tumoral que favorece a su crecimiento, lo que conlleva peor pronóstico (80, 84). Aún así, no se ha podido demostrar una asociación pronóstica con la concentración elevada de citoquinas mediadoras de la inflamación en el humor acuoso de ojos afectados de MU (86).

3.7.2.5. Necrosis y pigmentación

La presencia de necrosis se asocia a peor pronóstico (19).

Algunos estudios también han constatado una asociación pronóstica con el grado de pigmentación del MU (87).

3.7.3. Citogenéticos y molecular

A pesar de que las características clínicas e histológicas del MU han ayudado a definir cuales son los tumores con tendencia a un comportamiento más agresivo, los avances tecnológicos y científicos de la última década han permitido expandir nuestro conocimiento en la patogénesis molecular y la citogenética para poder predecir el riesgo de metástasis de los mismos de forma más precisa.

3.7.3.1. Alteraciones Citogenéticas

El análisis citogenético ha proporcionado una visión de los cambios cromosómicos que presenta el MU. La ganancia o pérdida de material cromosómico puede dar lugar a la regulación de oncogenes o genes supresores de tumor respectivamente (108). La pérdida de regiones de cromosomas se ha propuesto como un mecanismo de inactivación de genes supresores de tumor mientras que las ganancias estarían relacionadas con la de los oncogenes.

En la mayoría de MU el grado de inestabilidad genómica o aneuploidía es relativamente bajo si lo comparamos con otros tipos de cánceres.

Se han demostrado aberraciones cromosómicas recurrentes de los cromosomas 1, 3, 6, 8, 9, 11, 13, 16 y 21 (100, 102, 103, 104, 108). Las alteraciones más frecuentemente descritas son pérdida en los cromosomas 1p, 3, 6q, 8p y 9p y ganancia en los cromosomas 1q, 6p y 8q (108, 117, 128) siendo las pérdidas de 3, 1p, 6q y las ganancias de 8q las que se asocian a mal pronóstico (100).

La pérdida de una copia del Cr.3 (monosomía 3) se ha detectado hasta en el 50% de los MU y se asocia a unos índices de mortalidad del 42-54% entre 2 a 8 años de

seguimiento (100). Se ha demostrado que el 50-70% de los pacientes que la presentan, desarrollan metástasis a distancia en unos 5 años desde el diagnóstico inicial del tumor mientras que los pacientes que muestran disomía del Cr.3 raramente desarrollan metástasis (105). La presencia de monosomía 3 también se asocia a factores clínicos e histológicos de mal pronóstico (gran tamaño, localización en cuerpo ciliar, celularidad epitelioides, alto índice mitótico, patrón vascular en lazos o bucles y extensión extraocular) (100, 107). El estado del Cr.3 puede ser heterogéneo en el mismo tumor mostrándose áreas con monosomía 3 y otras con disomía 3 (101).

La pérdida del Cr.1p (28-34%) se ha visto más frecuentemente junto a la presencia de monosomía 3 y se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de metástasis y a un peor pronóstico (106).

Respecto a las alteraciones observadas en el Cr.6, las ganancias en 6p (28-54%) se correlacionan con un mejor pronóstico y su presencia es mutuamente excluyente con la monosomía 3 (109), mientras que la pérdida de 6q (35-37%) se asocia a peor pronóstico ya que se ha visto en el 40% de tumores que metastatizan respecto al 7% de los que no lo hacen (110).

En cuanto a las alteraciones del Cr.8, la ganancia del brazo q se ha observado en el 42-54% de los tumores y se ha asociado al desarrollo de enfermedad metastásica (111). Con frecuencia coexiste con la monosomía 3 mostrando una relación pronóstica peor que con las ganancias de 8q o monosomía 3 aisladas (108). Además la ganancia de Cr.8q adquiere peor pronóstico cuando tiene asociada una pérdida de Cr.8p. Esta asociación se describe en aproximadamente el 25% de los MU con ganancia de Cr.8q y monosomía 3 (117). Las ganancias de Cr.8q también se han asociado a factores pronósticos histológicos como gran tamaño, localización en cuerpo ciliar, celularidad epitelioides alto índice mitótico y patrón vascular en lazos o bucles (100).

El estudio y la detección de las alteraciones a nivel cromosómico se realiza mediante el análisis de tejido tumoral de cortes histológicos en ojos enucleados, y de muestras de tumor que se obtienen mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF) en aquellos tumores que se tratan con placa de radioterapia, previa a su colocación. La PAAF se efectúa, según la localización del tumor anterior o posterior al ecuador del globo ocular, por vía transescleral o transvítrea respectivamente siendo una técnica

segura y con mínimos daños colaterales (113). Cabe destacar que la muestra que se obtiene puede no ser representativa de la totalidad del tumor debido a una limitación de muestreo (103). Las técnicas diagnósticas utilizadas han sido varias entre las que destacamos el cariotipado, hibridación in situ con fluorescencia (FISH) como técnicas más clásicas, y la hibridación genómica comparada (CGH), perfil de expresión génica (PEG), análisis de microsatélites (MSA), análisis de polimorfismos (single nucleotide polymorphism (SNP)), y la técnica de MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) como las más actuales que pueden conseguir cada vez información más completa y exacta (102, 112, 113, 114, 116).

Mediante PEG, los melanomas uveales se clasifican en dos grupos con repercusión pronóstica (114, 115, 116) (figura 18 y tabla 4):

- **Clase 1:** Asociada a mejor pronóstico. Son tumores con disomía del Cr.3, ganancias del Cr.6p. Raramente desarrollan metástasis. Según el índice de mortalidad a los 5 años de subclasifican en 1A y 1B.

- 1A: mortalidad a los 5 años del 2%.

- 1B: mortalidad a los 5 años del 21%.

- **Clase 2:** Asociada a peor pronóstico. Son tumores con monosomía del Cr. 3. Presentan mayor número de aneuploidías cromosómicas. Alto índice de desarrollo de metástasis y de mortalidad (40-60% a los 5 años).

- 2A: tumores diploides para Cr.8p.

- 2B: tumores que también presentan ganancia de Cr.8p (25%).

Conlleva mayor agresividad al tumor.

Una de las razones de la superioridad del PEG y no de las técnicas clásicas de citogenética para la determinación del pronóstico es la heterogeneidad en la distribución de los marcadores citogenéticos en el seno tumoral que puede conllevar errores de muestreo (117).

El Collaborative Ocular Oncology Group validó PEG para la clasificación de los MU en los grupos 1 y 2 con el fin de determinar el pronóstico. 459 pacientes fueron clasificados en clase 1 y 2 mediante PEG y con una media de 17 meses de seguimiento, los pacientes con tumores de clase 1 desarrollaron metástasis en el 1% frente al 26% en los de clase 2. Concluyeron que PEG proporciona una mejoría significativa en la precisión del pronóstico sobre la clasificación del TNM y el estado

del Cr.3, y que este último no proporciona información pronóstica independiente de la aportada mediante PEG (118).

Pese haber identificado estas alteraciones, está por determinar si juegan un papel importante en el desarrollo del tumor o si son cambios secundarios en la progresión maligna del mismo. Tampoco está claro si los tumores de clase 1 y clase 2 se desarrollan de una misma célula o bien si son los de clase 1 que progresan a clase 2.

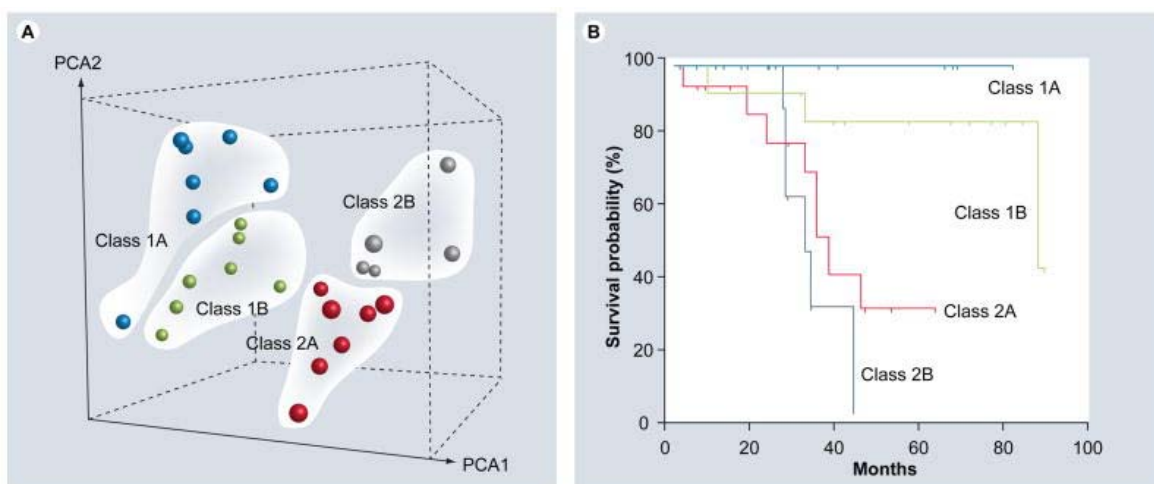


Figura 18: Clasificación molecular del MU basada en las características citogenéticas. (A): Grupos de MU según perfil de expresión génica. (B): Análisis de supervivencia Kaplan-Meyer según perfil de expresión génica. (123)

Tabla 4: melanoma uveal en base a clasificación molecular (116).

	CLASE 1	CLASE 2
Diferenciación celular	bien diferenciado	Stem-cells tipo células ectodérmicas
Citogenética	Disomía Cr. 3 ganancias Cr. 6p	Monosomía Cr. 3. 2A: diploide para Cr. 8p 2B: pérdida Cr. 8p (25%)
Aneuploidía cromosómica	Baja	Alta
Positividad para Ki-67	Baja	Alta
Índice de metástasis	Bajo	Alto
Índice de mortalidad a 5 años	1A 2%. 1B 21%	40-60%
Mutaciones de BAP-1	Infrecuente	Frecuente

3.7.3.2. Alteraciones moleculares

La secuenciación de última generación ha permitido detectar alteraciones en distintos genes, algunas con gran repercusión en la biología del tumor y otras silentes. En el MU estos genes mutados también se encuentran asociados a las clases moleculares del mismo. La identificación y caracterización molecular de estas mutaciones puede ayudar a entender el desarrollo y progresión del tumor. En el MU los genes más frecuentemente mutados y que se consideran claves en esta función son: *BAP1*, *SF3B1*, *EIF1AX*, *GNAQ* y *GNA11*.

BAP1: se encuentra codificado en el cromosoma 3p21. Tiene función de supresión tumoral actuando a nivel de la proliferación celular, inhibición de crecimiento tumoral (120) y respuesta a daño del ADN (129). Mutaciones somáticas de *BAP1* se observan en el 18-45% de los MU, son inactivadoras, a menudo truncadoras y se asocian a MU de clase 2, monosomía 3, pacientes de edad avanzada y peor pronóstico (129). Harbour y colaboradores en 2010 encontraron mutaciones somáticas y una germinal que inactivaban *BAP1* en el 84% de metástasis de MU. Vieron que estas se daban en estadios avanzados de la progresión tumoral coincidiendo con el desarrollo de metástasis y sugirieron que dicho evento era clave para la adquisición de la capacidad metastatizante del tumor (119). Mutaciones somáticas de *BAP1* también se han identificado en carcinomas de mama, pulmón, mesoteliomas pleurales malignos, melanoma cutáneo y carcinoma renal (117, 121). Abdel-Rahman describió un síndrome de cáncer hereditario causado por mutaciones de *BAP1* en la línea germinal que predispone a los pacientes a desarrollar MU, cáncer de pulmón, meningioma y posiblemente otros tumores (120).

La inmunohistoquímica es una técnica económica y rápida que permite valorar el estado mutacional de *BAP1* con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97% (121).

SF3B1: se encuentra codificado en el cromosoma 2q33. Es un componente del spliceosoma y está involucrado en el proceso de unión "splicing" de pre-ARNm. Esta mutación se encuentra en el 19% de los MU y se asocia a los MU de clase 1, disomía del Cr.3, pacientes jóvenes, desarrollo tardío de las metástasis y a buen pronóstico (122, 129).

EIF1AX: es el factor de iniciación de la traducción eucariótica 1A ligado al Cr.X, se codifica en el cromosoma Xp22. Está involucrado en la función de iniciación de la traducción proteica. Sus mutaciones se observan en el 24% de los MU y se asocian a MU de clase 1, disomía del Cr.3 y a buen pronóstico (122).

Las mutaciones de *BAP1*, *SFEB1* y *EIF1AX* son mutuamente excluyentes entre si (129).

GNAQ Y GNA11: se encuentran íntimamente relacionadas y acopladas a las dos subunidades del receptor de proteína G (*GNAQ* codifica la subunidad $G_{\alpha Q}$, que se encuentra en el Cr.9p21 y *GNA11* codifica la subunidad $G_{\alpha 11}$ que se encuentra en el Cr.19p13). La función de estos genes es la de mediar la señalización entre los receptores de la proteína G y las moléculas que se encuentran por debajo que regulan la vía de MAPK (129). Son de tipo oncogénico y conducen a una activación constitutiva de ambas subunidades mediante la anulación de su actividad GTPasa intrínseca, necesaria para devolverlas a su estado inactivo, lo cual provoca la activación de vías de señalización de proliferación, diferenciación y apoptosis tales como la de proteína quinasa C (PQC), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Las mutaciones de *GNAQ* también pueden activar la vía de señalización de PI3K/AKT en el MU.

En el MU se observan mutaciones de *GNAQ* en el 28-50% de los casos y de *GNA11* en el 32-50% (129). Sus mutaciones son mutuamente excluyentes. También están presentes en los nevus uveales, en los que parece no ser suficientes para la transformación maligna a MU. No se correlacionan con la clase, con el índice de metástasis ni con la supervivencia, por lo que se postulan como evento temprano o iniciador en la progresión del MU. (117, 122, 123, 129).

BRAF: Pese a que en el melanoma cutáneo existen mutaciones de este gen, no son frecuentes en el MU (124, 125, 126).

BRCA1/BRCA2: También se han descrito mutaciones germinales de *BRCA2* y aisladamente de *BRCA1* en pacientes con MU y historia familiar o personal de cáncer de mama (125). No hay suficientes estudios para determinar la frecuencia de

estas mutaciones en dicha población con el fin de establecer si el MU pudiese ser un tumor relacionado a mutaciones de *BRCA*.

Las alteraciones moleculares descritas y otras menos importantes se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Alteraciones genéticas conocidas del melanoma uveal (128).

	<i>Mecanismo</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Frecuencia %</i>
Proto-oncogenes			
<i>NRAS</i>	mutación	1p13	raro
<i>BRAF</i>	mutación	7q34	raro
<i>NSB1</i>	amplificación	8q21	50
<i>MYC</i>	amplificación	8q24	43
<i>DDEF (ASAP1)</i>	amplificación	8q24	50
<i>CCND1</i>	amplificación	11q13	65
<i>MDM2</i>	amplificación	12q15	65
<i>BCL-2</i>	amplificación	18q21	>95
Genes supresores tumor			
<i>LZTS1</i>	delección	1p13	-
<i>CDKN2A-esporádico</i>	delección, mutación	9p21	raro
<i>CDKN2A-familiar</i>	delección, mutación	9p21	raro
<i>PTEN</i>	delección, mutación	10q23	15

4. Patogénesis del cáncer (hallmarks)

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por ser una proliferación celular clonal descontrolada, que adquiere de forma gradual y progresiva todas o la mayoría de las capacidades o características de identidad (hallmarks) propuestas por Hanahan y Weinberg en el año 2000 y posteriormente revisadas en el 2011 por los mismos autores (130, 131).

Estas señales de identidad proporcionan una sólida base para entender la biología del cáncer. Son fundamentales e indispensables para que la célula neoplásica pueda sobrevivir y proliferar en su sitio de aparición inicial, o primario, así como para su habilidad de invadir tejidos circundantes y metastatizar en órganos a distancia. Cada neoplasia las adquiere mediante distintos mecanismos y en diferente momento durante el curso evolutivo escalonado de la génesis tumoral. Las características básicas son: (a) insensibilidad a las señales anti-crecimiento, (b) autosuficiencia en

las señales de crecimiento, (c) evitar los mecanismos de apoptosis, (d) potencial replicativo ilimitado, (e) angiogénesis sostenida, (f) invasión tisular y metástasis (figura 19 A).

Gracias a los avances científicos, en los últimos años se han añadido dos capacidades más a esta lista conocidas como capacidades emergentes, consideradas funcionalmente importantes en el desarrollo del cáncer: (g) la de modificar o “reprogramar el metabolismo celular” para dar soporte a una proliferación tumoral más efectiva y (h) la evasión de la destrucción por el sistema inmune, que permite que las células cancerígenas escapen a la destrucción que ejercen sobre ellas los linfocitos T y B, los macrófagos y las células “natural killer”. A parte de estas capacidades básicas y emergentes cabe destacar la “inestabilidad genómica”, que es la base con la que los tumores logran dotarse de tales características, y la “inflamación” que las promueve (figura 19 B).

Además de las células tumorales, que en sí son unas máquinas complejas, los tumores muestran otra dimensión de dificultad. Estos tienen un gran número de células normales de los tejidos circundantes, como el estroma que los sustenta, cuya interacción contribuye a la adquisición de todas las capacidades descritas mediante la creación de un “microambiente tumoral”.

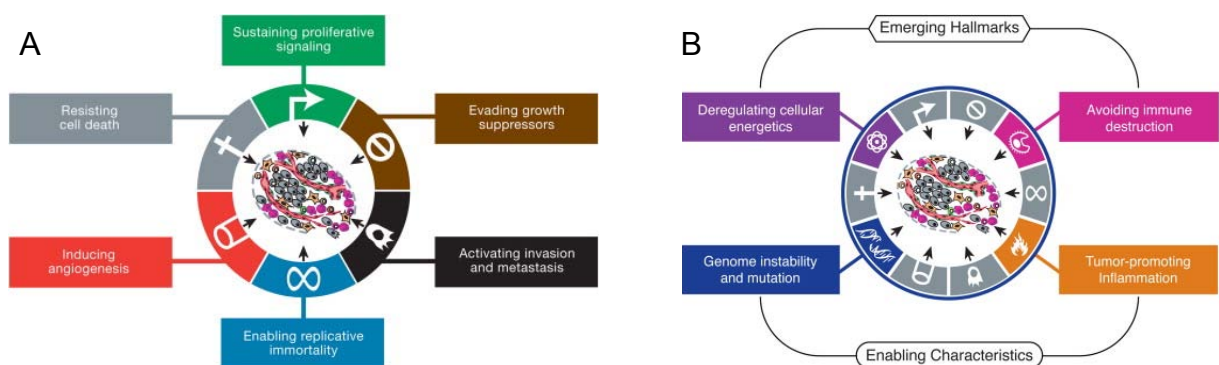


Figura 19. A) Hallmarks of cancer. B) Emerging hallmarks and enabling characteristics. (130, 131)

5. Patogénesis del melanoma uveal.

El MU también cumple con el modelo propuesto por Hanahan y Weinberg (128).

Capacidades inicialmente descritas:

1. *Insensibilidad a las señales anti-crecimiento*

La pérdida de inhibición del ciclo celular se consigue mediante la inhibición funcional de la vía del Retinoblastoma. A pesar de que mutaciones en los genes de *RB1* son muy raras, la proteína del retinoblastoma (RB) se encuentra constitutivamente hiperfosforilada y funcionalmente inactiva en la mayoría de MU, en el 65% de los casos debida a una sobre-expresión de la proteína Ciclina D1, lo cual se ha asociado a factores clásicos de mal pronóstico tales como mayor diámetro tumoral y tipo histológico epitelioides. También se ha propuesto la hipermetilación del promotor de *CDKN2A* (gen que codifica para la proteína P16) como un mecanismo adicional de inactivación de la RB. En el año 2001 van der Velden y colaboradores vieron que la metilación del promotor del gen *CDKN2A* era un evento común en su serie de casos con MU primario (32%) y en las líneas celulares de MU que estudiaron (50%), cómo resultado había una pérdida de expresión de P16. También observaron un mayor desarrollo de metástasis en el grupo de casos de MU con hipermetilación del promotor del gen *CDKN2A* (138).

El *CDKN2A* se encuentra frecuentemente inactivado y tiene un papel como “gen supresor de tumor” en muchos tipos de cáncer, bien por deleciones como se han descrito en el melanoma cutáneo, cáncer de esófago, pulmón, páncreas, urotelial, cabeza y cuello, mama, cerebro, ovario, mesotelioma, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma y líneas celulares de carcinoma renal, o bien por mutaciones como en el melanoma cutáneo familiar. Es un gen formado por 3 exones que codifican 156 aminoácidos para formar una proteína que tiene por función bloquear la progresión del ciclo celular, en el punto de G1-S mediante la unión a la quinasa dependiente de ciclina 4 o 6 (CDK4, CDK6) e inhibiendo la acción de la Ciclina-D. Esta ciclina formará parte de un complejo catalítico que va a fosforilar la RB para entrar en la fase S del ciclo celular. Así pues, el mayor efecto bioquímico que tiene P16 es detener la progresión del ciclo celular en G1/S y la pérdida de su función puede

conducir a la progresión del cáncer al permitir la proliferación celular no regulada (139, 140) (ver figura 20).

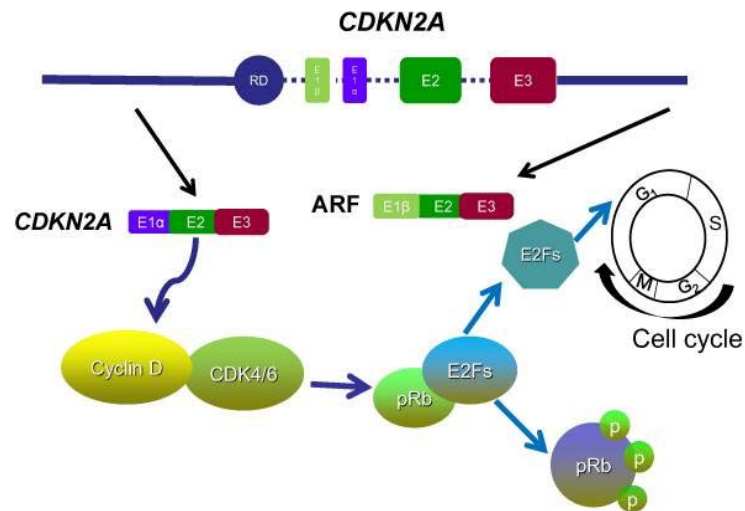


Figura 20. Esquema del locus de CDKN2A y función de P16 en la célula. P16 (CDKN2A) une a Ciclina-D y CDK4/6 e inhibe la activación del factor de transcripción E2F1 a través de RB lo cual permite que la célula entre a la fase S del ciclo celular (140).

2. Autosuficiencia en las señales de crecimiento

El MU logra la inducción continua del ciclo celular mediante varios mecanismos. Uno de ellos es la activación constitutiva de la vía de PI3K-AKT. El otro es la activación constitutiva de la vía de RAF/MEK/ERK (MAPK) promovida mediante mutaciones en GNQA y GNQ11 que se describen en el 80% de los MU.

3. Evitar los mecanismos de apoptosis

La apoptosis se evita a través de alteraciones en la vía de P53, que se encuentra funcionalmente bloqueada por su inhibidor MDM2, defectos en la vía de Bcl-2 y mediante la activación constitutiva de la vía de PI3K-AKT a través de la regulación negativa de PTEN.

4. *Potencial replicativo ilimitado*

En el MU se produce una desregulación de la actividad de la Telomerasa pasando a tener una función constantemente activa, consiguiendo una replicación celular tumoral ilimitada.

5. *Angiogénesis sostenida*

La producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se encuentra aumentada. Hay una sobreexpresión del VEGF inducida tanto por las células tumorales como por la celularidad inflamatoria acompañante. Además la expresión de IGF-1 y IGF-1R están incrementados.

6. *Invasión tisular y metástasis*

La invasión de los tejidos está mediada por la activación de E-Cadherina. Esta se consigue por una regulación positiva de las vías de señalización de E-Cadherina y Wnt/beta-catenina, por la regulación negativa de helix-loop-helix inhibitor ID2, la expresión aumentada de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y la regulación negativa de sus inhibidores tisulares (TIMP) por parte del MU. También están implicados la expresión de ALCAM (CD166), la activación de la vía de NOTCH y la metilación bialélica del gen *EFS*, (involucrado en la adhesión celular y transducción de señales intracitoplasmáticas).

Capacidades Emergentes:

1. *Inflamación*

En el MU se han observado varias densidades de células inflamatorias. Tanto la presencia de linfocitos como macrófagos se han asociado a un peor pronóstico (80, 81, 83).

2. *Inestabilidad genómica y mutaciones*

Se sabe que las alteraciones cromosómicas y moleculares que presenta el MU son distintas a las de los melanomas de piel. Todas ellas tienen importancia clínica ya que se han correlacionado con el riesgo de metástasis y el pronóstico. (Ver capítulo 3.7.3.1 y 3.7.3.2). El conocimiento de dichas alteraciones citogenéticas y

moleculares ha permitido proyectar un modelo de desarrollo y progresión para el MU (ver capítulo 8).

3. Reprogramación del metabolismo celular

La regulación positiva de los transportadores de glucosa como GLUT1, resulta en un incremento significativo de la importación de glucosa hacia el citoplasma. La hipoxia hace que el tumor responda con una regulación positiva de los transportadores de glucosa y de múltiples enzimas de la vía de señalización de la glicolisis.

4. Evasión de la destrucción por el sistema inmune

El MU consigue evitar que el sistema inmune del organismo destruya sus células a través de tres sistemas: la reducción de la inmunogenicidad de la célula tumoral, que se consigue con la expresión de PDL-1, la cual regula la función de los linfocitos T mediante supresión de la actividad de IL-2 que conduce a dañar su función, la regulación negativa de la expresión de los antígenos HLA de clase 1 y finalmente un agotamiento de las células T.

6. Vías de RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) Y PI3K-AKT-mTOR en el cáncer

Las células se comunican entre ellas y responden a estímulos ambientales a través de vías de transducción de señales. Alteraciones en estas vías dan lugar a respuestas anómalas como ocurre en el cáncer. En los últimos años, nuevos conocimientos han permitido avanzar en el estudio de la biología molecular del cáncer y en concreto en la relación y las implicaciones patológicas de algunas moléculas integradas en las vías de señalización. Las vías de MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) y PI3K-AKT-mTOR tienen una especial importancia.

6.1 Vía de MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)

Las reacciones en cadena de MAPK (Mitogen-activated protein kinasa) son vías de transducción de señales intracelulares, conservadas evolutivamente, que responden a diversos estímulos extracelulares y controlan un gran número de procesos

celulares fundamentales como crecimiento, proliferación, diferenciación, motilidad, respuesta a estrés, supervivencia y apoptosis (141, 142).

Cada cascada de reacción en cadena está formada por 3 quinasas centrales con moléculas reguladoras que se encuentran por encima (upstream components) y por debajo de las mismas (downstream components). Dichas reacciones en cadena se propagan mediante fosforilación y activación secuencial de las quinasas que conducen a la fosforilación y activación de proteínas diana reguladoras de una determinada función. Hasta el momento actual se han identificado 4 tipos de cascadas de MAPKs que se nombran según las quinasas que las forman y las regulan: quinasa ERK1/2, JNK, p38 y ERK5 (141).

La vía de ERK1/2 fue la primera en describirse. ERK1/2 se activa por MEK1/2 que a su vez lo activa RAF, en cualquiera de sus isoformas (RAF-A, RAF-B o RAF-C). RAF se activa por una proteína con acción GTPasa, RAS. Los miembros de la familia de proteínas RAS son K-RAS, H-RAS, y N-RAS, tienen gran importancia en la transmisión de señales hacia el interior de las células y se activan a través de un receptor con actividad tirosina-quinasa (142). (Ver figura 21).

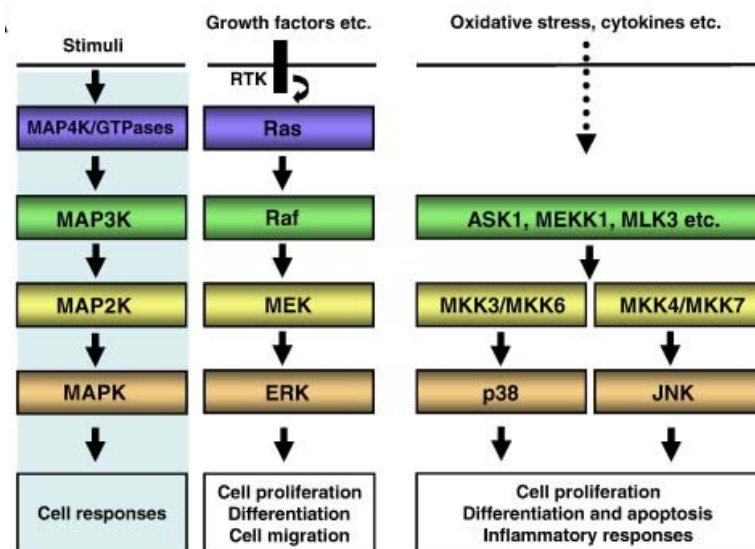


Figura 21. Vías de señalización de MAPK. La familia de MAPK incluye ERK1/2, ERK 5, p38 y JNK (142).

La vía de ERK tiene un papel central en la señalización de una gran variedad de agentes extracelulares que operan a través de varios receptores. Unos de los que participan en esta vía son los de la familia de HER (receptor del factor de crecimiento epitelial humano). Esta familia tiene varios miembros, HER1 (también conocido como EGFR), HER2, HER3 y HER4 (ver tabla 6).

HER3 (Receptor de la tirosina quinasa 3), a diferencia de los miembros de su familia, no posee un dominio de quinasa activo y por esta razón, en un estado homodimérico, no puede transmitir señales hacia la célula a través de la fosforilación de proteínas. En su lugar, se basa en la heterodimerización con otros miembros de la familia HER para poder emitir señales hacia la célula, responsables de la proliferación y diferenciación celular. Mediante tinción inmunohistoquímica se ha reportado expresión de HER3 tanto a nivel nuclear como citoplasmático (140).

Por su papel crítico en el desarrollo de la actividad de la célula en funciones clave como la proliferación, diferenciación, supervivencia o muerte, la vía de MAPK se ha visto implicada en la patogénesis de muchas enfermedades en humanos, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Muchos tipos de cánceres se han asociado a mutaciones en alguno de los componentes que forman parte de esta vía. Estas mutaciones tienen como resultado una activación constitutiva de la misma que da lugar a una proliferación inapropiada y autónoma de la célula neoplásica.

Amplificaciones o sobreexpresiones de RAS, probablemente debidas a la metilación alterada de la región del promotor se han detectado en algunos tumores (148). Mutaciones de K-RAS ocurren con frecuencia en cánceres de páncreas (60%), colon (32%) y pulmón (19%), mientras que en el 27% de carcinomas de tiroides y en 43% de los melanomas cutáneos se han detectado mutaciones de B-RAF la más frecuente la mutación V600E, y en la leucemia mieloide aguda mutaciones de N-RAS (14%) y C-RAF (ver tabla 7). MEK1 y MEK2 están mutados en ciertos cánceres (ovario y pulmón) y pueden ser “mutaciones principales” (148). También hay mutaciones a nivel de receptores que pueden activar esta vía, las presentan algunos cánceres tales como el adenocarcinoma de pulmón que en el 80% de los casos presenta una activación anormal del receptor EGFR (por mutación en dominio tirosina quinasa), fenómeno observado también en el cáncer de colon (por sobreexpresión proteica) (142, 144).

La vía de ERK también juega un papel importante en los diferentes estadios del desarrollo tumoral ya que a través de diferentes reacciones e interacciones promueve la migración celular, la degradación de las proteínas de la matriz extracelular facilitando la invasión tumoral, y facilita la supervivencia de las células tumorales. Así pues, la vía de MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) se considera una objetivo terapéutico fundamental para el desarrollo de fármacos. (Ver figura 22)

Tabla 6. Tipos de cánceres asociados a alteraciones en los receptores de la familia HER (167)

HER1	HER2	HER3	HER4
Vejiga urinaria*	Vejiga urinaria		
Mama*	Mama*	Mama	Mama
Cervix*			
			Leucemia Mieloide Cronica
Colo-rectal	Colo-rectal*		
Endometrio*	Endometrio*	Endometrio*	
Esófago*	Esófago		
Cabeza y cuello*	Cabeza y cuello*	Cabeza y cuello*	Cabeza y cuello*
Glioma*			
Pulmón*	Pulmón*	Pulmón*	Pulmón
Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma
Ovario*	Ovario*	Ovario	Ovario*
Páncreas*			Páncreas
Próstata	Próstata*	Próstata	Próstata
Renal	Renal	Renal	
Sarcomas			
Piel			Piel
Gástrico*	Gástrico*		
Tiroides		Tiroides	Tiroides

* Estudios clínicos han asociado sobreexpresión y/o mutación de estos receptores HER a peor pronóstico

Tabla 7. Mutaciones de HRAS, KRAS, NRAS, y BRAF del cáncer en humanos (144).

Tipo de Cáncer	HRAS	KRAS	NRAS	BRAF
Vía Biliar	0%	33%	1%	14%
Vejiga urinaria	11%	4%	3%	0%
Mama	0%	4%	0%	2%
Cérvix	9%	9%	1%	0%
Endometrio	1%	15%	0%	1%
Riñón	0%	1%	0%	0%
Hígado	0%	8%	10%	3%
Pulmón	1%	19%	1%	2%
Melanoma	6%	2%	18%	43%
Leucemia mieloide	0%	5%	14%	1%
Ovario	0%	17%	4%	15%
Páncreas	0%	60%	2%	3%
Tiroides	5%	4%	7%	27%

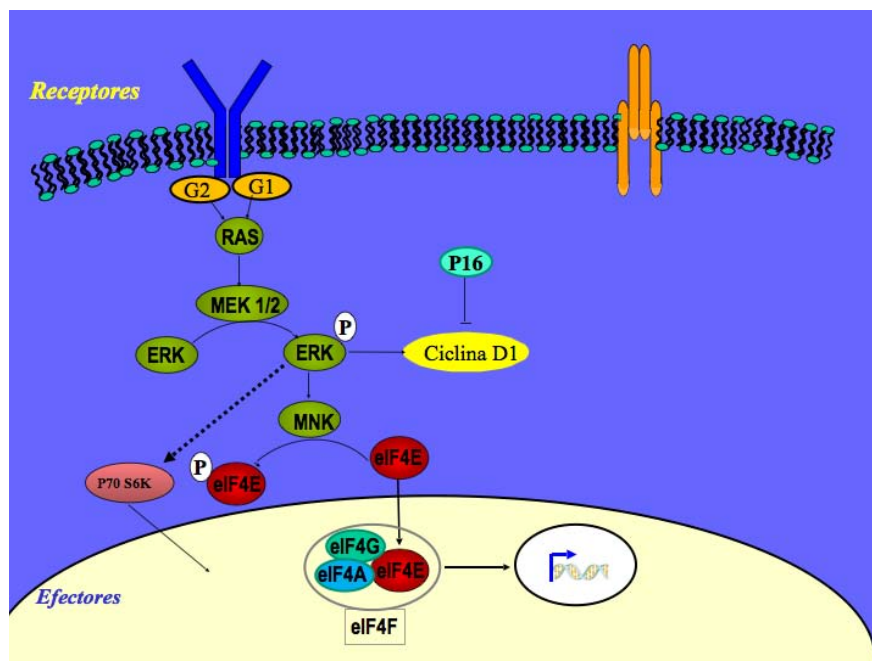


Figura 22. Representación esquemática de la vía de MAPK. Esquema de elaboración propia.

6.2. Vía de PI3K-AKT-mTOR

La vía de PI3K-AKT-mTOR asimila señales intracelulares y extracelulares para el control del metabolismo, el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular (145). La activación de la señalización de esta vía contribuye en la patogénesis de muchos tipos de tumores ya que a través de las señales que la forman controla procesos celulares clave como la transcripción, la apoptosis, progresión en el ciclo celular y la traducción proteica (145) por lo que promueve el crecimiento tumoral protegiendo a las células de la apoptosis y aumentando la proliferación de las mismas (134).

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) es una enzima miembro de la familia de las quinasas intracelulares lipídicas cuyo papel principal es la transducción de señales hacia la célula. Puede activarse por diferentes estímulos: mediante la activación de receptores por su unión a una señal o bien mediante oncogenes (145). Existen tres grupos de PI3Ks (clase I, II y III), se clasifican según el sustrato al que se unen y la homología de la secuencia que activan, y cada una tiene un papel diferente en la transducción de señales (146). Las PI3K Clase I se dividen en dos grupos según el receptor al que se acoplan: las de Clase IA se unen y se activan por el receptor del factor de crecimiento tirosin-quinasa (RTQs) o RAS, las de Clase IB se unen y se activan por el receptor acoplado a proteína G (GPCR) o RAS. Las PI3K de Clase II se activan a través de los receptores de insulina, receptores del factor de crecimiento e integrinas. Las PI3K de clase III se cree que están constitutivamente activas (145). Las enzimas PI3K de Clase I son las más importantes de cara a la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR ya que catalizan la conversión de PIP2 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) a PIP3 (phosphatidylinositol 4,5-trisphosphate) (ver figura 23). Cuando una señal se acopla a un receptor RTQ o GPCR este se activa dando lugar a la autofosforilación sobre residuos de tirosina. PI3K es reclutado a la membrana y activado lo que permite la fosforilación de PIP2 hacia PIP3. Esta reacción recluta un subconjunto de proteínas de señalización para finalmente activar AKT (147). Alteraciones en PI3K tales como mutaciones y amplificaciones del gen *PIK3CA* dan lugar a una activación de AKT, en ausencia de una estimulación del receptor, y están implicadas en la patogénesis de distintos tipos de cáncer (146) (ver tabla 8).

PTEN es una molécula clave en la regulación de esta vía. Se codifica en el cromosoma 10q23 y es una fosfatasa con actividad dual en lípidos y proteínas que favorece la conversión de PIP3 a PIP2 de modo que disminuye la activación de AKT y actúa como regulador negativo (supresor tumoral) de la vía de PI3K/AKT/mTOR (147) (ver figura 23).

La pérdida de la función de PTEN da como resultado un incremento de la activación de la vía. En el cáncer la pérdida de actividad de PTEN puede ocurrir por múltiples mecanismos: mutaciones germinales (resultando en el síndrome de Cowden y de Bannayan-Riley-Ruvalcava), mutaciones somáticas (como delección o inactivación del gen), y fenómenos epigenéticos que disminuyen su expresión tales como metilación del promotor, expresión aberrante de microRNA reguladores, inestabilidad y fosforilación de proteínas (146, 147) (ver tabla 8).

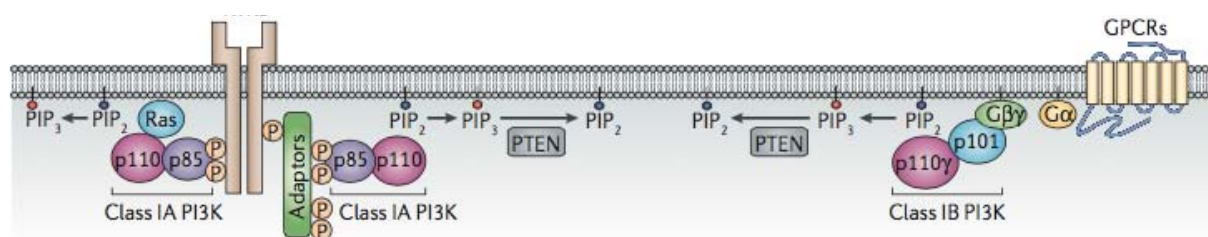


Figura 23. Esquema de la activación de PI3K, conversión de PIP2 a PIP3 y de la acción de PTEN como regulador negativo (146).

AKT es una proteína serina/treonina quinasa de la familia de las AGC quinasas (pertenecientes a las quinasas AMP/GMP y proteína quinasa C) (145). Existen 3 isoformas de AKT que se expresan en todos los tipos celulares y tejidos, AKT1, AKT2, AKT3 (145). Esta proteína regula tanto mecanismos de crecimiento (transcripción, traducción y progresión en el ciclo celular) como supervivencia (apoptosis, autofagia) y metabolismo en la célula y lo hace mediante la fosforilación de un gran número de sustratos. Sobre ellos AKT activado tiene una función tanto como regulador positivo como negativo (145, 147) (ver figura 24). AKT juega un papel importante en la traducción de proteínas ya que media la regulación de mTOR a través de un proceso de múltiples pasos muy complejos (145, 146). Alteraciones

de AKT en forma de mutaciones o amplificaciones se han descrito en distintos tipos de cáncer (ver tabla 8).

mTOR (mammalian target of rapamycin) es una proteína serina/treonina quinasa citoplasmática, evolutivamente conservada, esencial para la vida, que actúa como sensor de mitógenos, energía y nutrientes y regula el crecimiento, proliferación, motilidad y supervivencia celular mediante el control que ejerce sobre los reguladores del ciclo celular (145, 147, 148). mTOR está formado por dos complejos: (a) mTORC1 que es sensible a rapamicina y (b) mTORC2 que no es sensible a rapamicina.

mTORC1 es activado por AKT de forma directa a través de la vía de PI3K (145). Se le imputa ser regulador de varios procesos y, entre ellos, tiene un papel principal en regulación de la síntesis proteica en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento y lo ejerce mediante la fosforilación de los sustratos P70S6K (p70S6 *kinase*) y 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) (ver figura 24) (149).

Cuando mTOR está activo fosforila P70S6K la que permite la fosforilación de la proteína 40S ribosomal (S6RP) que permite la traducción activa de mRNA. S6 (Proteína S6 ribosomal) fosforilada se encuentra activada y actúa en la homeostasis de la glucosa. Resulta esencial para la regulación del tamaño de algunos tipos celulares e indispensable para el control y eficacia de la traducción del mRNA en 5'-TOP (150, 151).

El gen *P70S6K* se encuentra amplificado en carcinomas de mama (148) (ver tabla 8).

mTORC1 activado también fosforila 4E-BP1 impidiendo su unión a EIF-4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) promoviendo la traducción de proteínas Cap-dependiente (145, 149).

4E-BP1 es una proteína que pertenece a la familia 4E-BP, con tres formas conocidas (4E-BP1, 2 y 3) y es considerada “supresora de la traducción” ya que juega un papel muy importante en el control de la síntesis de proteínas por el ribosoma a través de su unión con EIF-4E (149). Unidos se inhibe la formación del complejo de traducción (EIF-4F). Dicho complejo se forma a partir de la unión entre EIF-4E y EIF-4A promovida por la proteína de unión EIF-4G, que a su vez actúa como módulo adaptador para la unión de EIF-4E al ribosoma, uniendo la subunidad ribosomal 40S al extremo 5' del RNA mensajero. La fosforilación de 4E-BP1 (p4E-BP1 (Translation

repressor protein 4E-BP1)) da como resultado la separación entre 4E-BP1 y EIF-4E liberando a éste último para poder entrar a formar parte del complejo iniciador de la traducción (EIF-4F) y finalmente activando la síntesis de proteínas (148, 152). EIF-4E es un componente clave para la traducción del extremo 5' del mRNA y se regula mediante fosforilación resultando en pEIF-4E. Esta reacción está mediada por quinasas del grupo MNK (1 y 2). El papel de pEIF-4E, en la actualidad, se desconoce (152, 153). (Ver figura 25).

Se ha observado sobreexpresión de p4E-BP1 en melanoma cutáneo (133), carcinomas de mama (155), ovario (156), próstata (157), asociándose todos ellos a mal pronóstico.

Niveles elevados de EIF-4E poseen un efecto oncogénico (152, 153). Se ha demostrado una sobreexpresión de EIF-4E en carcinomas de mama, carcinomas escamosos de cabeza y cuello, vejiga urinaria, próstata, adenocarcinomas de pulmón, cérvix y en linfomas no Hodgkin (154). EIF-4E también se considera un protooncogén por su implicación en la traducción del extremo 5' del mRNA en el que se codifican proteínas oncogénicas que promueven la proliferación y supervivencia celular tales como C-MYC, Ciclina-D1, CDK2, STAT-3 y Bcl-2 entre otros (148).

Tabla 8. Alteraciones en la vía de PI3K/Akt/mTOR para distintos tipos de cáncer y su frecuencia. (Datos extraídos de las referencias 145, 146, 148).

Alteración Genética	Tipo de cáncer	Frecuencia en %
PIK3CA Mutación	Mama	26
	Colo-rectal	26
	Glioblastoma	8
	Endometrio	24-32
	Hepatocelular	36
	Ovario	10
	Gástrico	7
PIK3CA Amplificación	Pulmón	2
	Cérvix	69
	Gástrico	36

Alteración Genética	Tipo de cáncer	Frecuencia en %
	Pulmón - escamoso - Adenocarcinoma	60
	Cabeza y cuello	37
	Ovario	25
	Mama	9
	Tiroides	9
	Esofago (adenocarcinoma)	6
PTEN Mutación	Glioblastoma	17-44
	Endometrio	36-50
	Gástrico	7
	Próstata	12
	Mama	0-4
	Melanoma	7-8
PTEN Pérdidas	Glioblastoma	54
	Endometrio	32-83
	Gástrico	47
	Próstata	29-35
	Mama	23-39
	Melanoma	37-57
Akt Mutación	Tiroides	5
	Endometrio	4
	Mama	4
Akt Amplificación	Cabeza y cuello	30
	Gástrico	20
	Páncreas	20
	Ovario	12
	Mama	3
p70S6K Amplificación	Mama	9

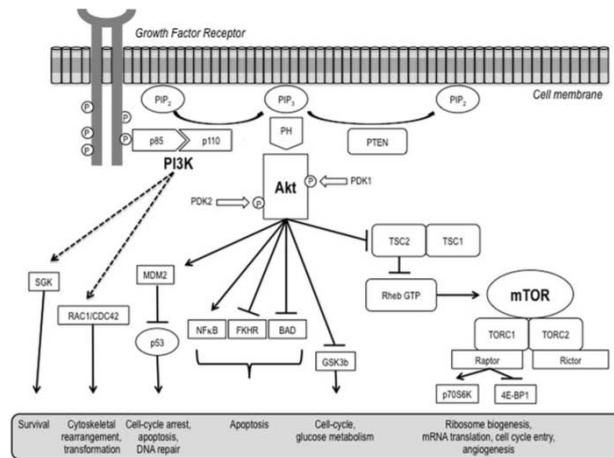


Figura 24. Esquema de la Vía de PI3K/AKT/mTOR. (*)La activación de AKT inhibe GSK3b lo cual conduce a disminuir los niveles de Ciclina-D1 para promover la proliferación celular regulando las fases G1/S del ciclo celular (147).

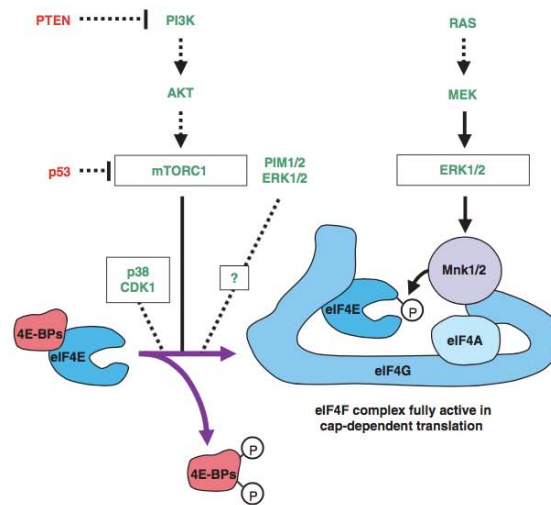


Figura 25. Esquema de la traducción de proteínas Cap-dependiente (153).

Finalmente la vía de PI3K/Akt/mTOR también puede estar activada debido a una activación incrementada de los receptores del factor de crecimiento de la superficie celular como resultado de una activación del receptor, una mutación o por factores de crecimiento que estimulan su receptor de forma autocrina.

La familia de receptores HER también tiene un papel importante en esta vía. Los heterodímeros HER2/HER3 son considerados unos potentes activadores de la

misma ya que las células tumorales con sobreexpresión o mutación de Her2 muestran una activación constitutiva de la misma (145) (ver tabla 6).

7. Vías de RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) Y PI3K-AKT-mTOR en el melanoma uveal

En el MU la vía de MAPK también tiene su función en la proliferación celular, controlada mediante la expresión de Ciclina-D1 (96).

La activación de esta vía no depende de la presencia de mutaciones en *BRAF*. Se ha visto que en líneas celulares de MU que expresan *BRAF* no mutado y en las pocas en las que *BRAF* presenta la mutación V600E, este gen tiene el mismo papel (132, 96).

Existen mutaciones de *GNAQ* y *GNA11* en el 80% de MU (117). Éstas conducen a una activación constitutiva de las subunidades Gaq y Ga11, de una proteína transmembrana, lo que conlleva una abolición de la función GTPasa que impide volver al estado inactivo de dicha proteína dando como resultado una activación constitutiva de la vía de MAPK, de igual forma que lo consiguen las mutaciones de *BRAF* o *NRAS* (129).

En cuanto a los receptores involucrados en la vía de MAPK Trocmé observó expresión nuclear de HER3 en el 70% de su serie de casos de MU (n=128). Este resultado se asoció a un pronóstico favorable (p=0.043; HR=0.618) (146).

En el MU, la activación de la vía de PI3K-AKT-mTOR ha sido reportada en varios trabajos (135, 95, 137). En él también promueve el crecimiento tumoral protegiendo a las células de la apoptosis y aumentando la proliferación de las mismas (134) y se activa en el contexto de mutaciones en la proteína-G. Hay interacciones de señalización involucradas con *GNAQ* y algunas isoformas de PI3K (136).

El grupo de Abdel-Rahman observaron una disminución en la expresión de PTEN en los MU primarios más agresivos, en comparación con los de curso más indolente, en el 60% de los casos evaluados (95).

Se ha demostrado un incremento de AKT fosforilado en el MU (135) y sus metástasis, sugiriendo su utilización como marcador de mal pronóstico (137).

Así pues, parece que también en el MU, ambas vías convergen en el control de la traducción de DNA para la síntesis de proteínas, en la fosforilación de 4E-BP1 y S6K

que cooperan, mediante el control de la expresión de Ciclina-D1, para regular la proliferación celular (ver figura 26).

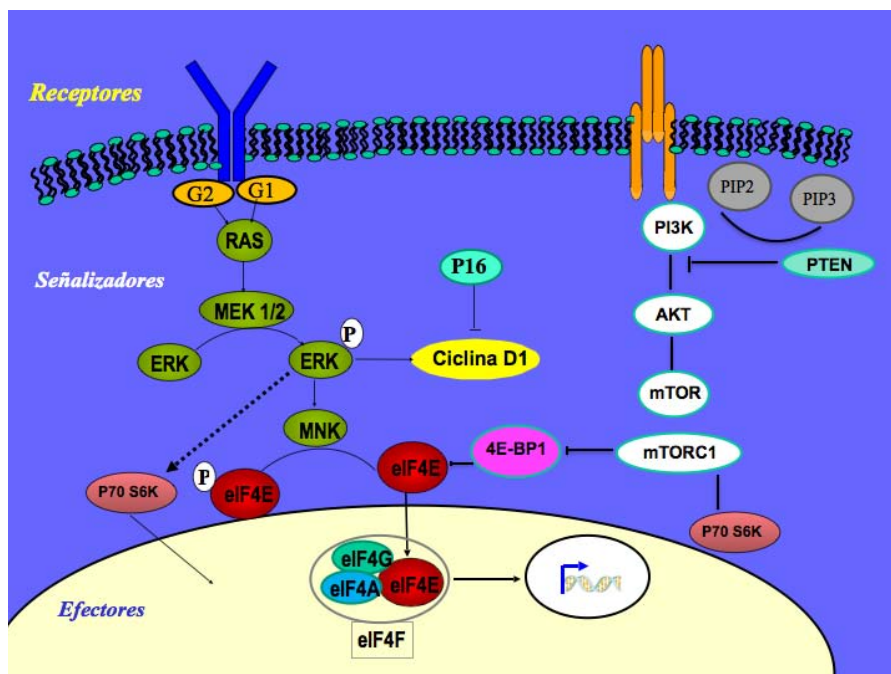


Figura 26. Vías de MAPK y PI3K/AKT/mTOR, convergencia en EIF-4E. Esquema de elaboración propia.

8. Modelo provisional de la progresión tumoral en el melanoma uveal

En base a todos los conocimientos que sabemos a día de hoy sobre el MU se han propuesto unos modelos para explicar el desarrollo y progresión del tumor.

8.1. Modelo de progresión basado en alteraciones genéticas

Lo que se conoce como evento inicial en la progresión del MU es una mutación activadora en *GNQA* o *GNQ11* que ocurriría en los melanocitos normales y conduciría a una proliferación “anormal” para quedar finalmente senescente dando como resultado un nevus o, siendo estas células mutadas, eliminadas por mecanismos de apoptosis o por el sistema inmune (bolas negras, ver figura 27). Las células que podrían progresar a partir de este momento hacia MU lo podrían hacer

mediante uno de los dos caminos caracterizados por el perfil de expresión génica como clase 1 y clase 2. El perfil de expresión génica de los melanocitos normales, de los nevus y de los tumores de clase 1 es muy parecido (bolas azules en la figura 27) y tienen muy bajo riesgo de metastatizar. Los melanomas de clase 2 (bola roja en figura 27) presentan mutaciones de *BAP1*, localizado en el Cr.3 (3p21) y pérdida de la otra copia del Cr.3, lo que sugiere que la pérdida bi-alélica de *BAP1* es clave en la progresión tumoral hacia la invasión metatásica. (117)

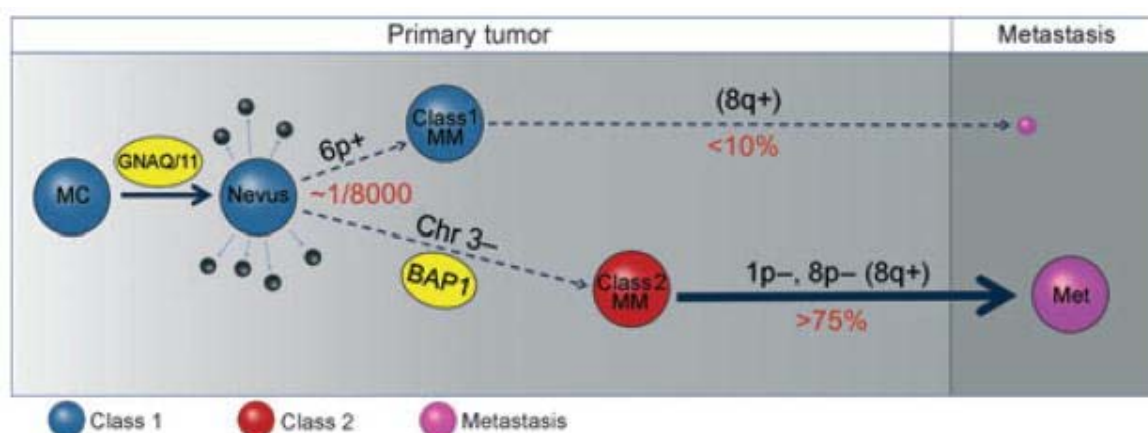


Figura 27. Resumen de los eventos moleculares principales en la progresión del MU (117).

8.2. Modelo provisional de la progresión basado en alteración de vías de señalización

Los eventos iniciales probablemente son aquellos que provocan una alteración de la regulación del ciclo celular. Tales mutaciones activan mecanismos supresores de tumor que dan lugar a apoptosis y/o senescencia. En la mayoría de los casos los mecanismos de apoptosis eliminan las células mutadas y los de senescencia arrestan estas células hacia un estado de nevo benigno.

El tumor puede continuar progresando si estos mecanismos se ven sobrepasados por otras mutaciones que puedan bloquear la apoptosis y promover la supervivencia celular. Casualmente dicha progresión puede dar lugar a un tumor que correspondería clínicamente a un melanoma uveal.

En sus estadios iniciales, el melanoma uveal tiene poca aneuploidía (clase 1A) y presenta un perfil de expresión génica relativamente uniforme. A medida que la progresión tumoral continua el tumor acumula otras alteraciones genéticas, tales como la ganancia del Cr.6p, que van a determinar el perfil de expresión génica de clase 1B, o las pérdidas del Cr.3 que son las que determinan el perfil de los de clase 2.

A medida que los tumores de clase 2A adquieren nuevas alteraciones genéticas, ganan en inestabilidad genómica y evolucionan a tumores de clase 2B, asociados a la pérdida de 8p y a la aparición rápida de metástasis (ver figura 28).

Los MU de clase 1 presentan diferenciación melanocítica y bajo riesgo de metastatizar mientras que los de clase 2 son poco diferenciados y tienden a presentar altos índices de metástasis.

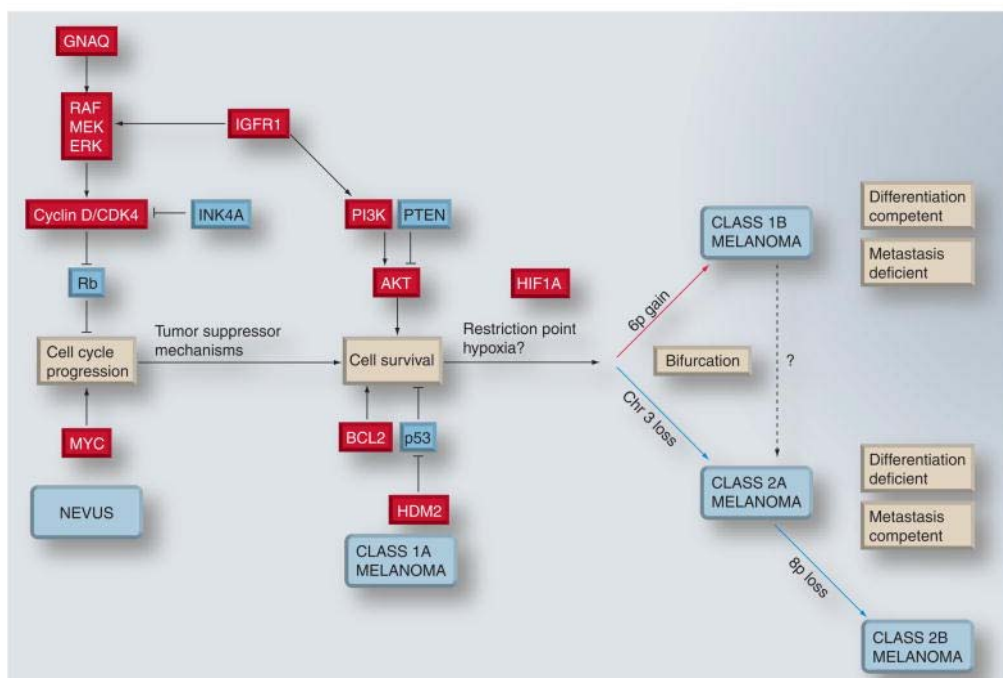


Figura 28. Esquema modelo provisional de progresión maligna del MU. En rojo se indican las ganancias cromosómicas y los genes "sobrexpresados". En azul se indican las pérdidas cromosómicas y los genes "infraexpresados" (123).

IV. HIPÓTESIS

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la última década se ha avanzado mucho en el conocimiento de la patogénesis molecular del cáncer, bien de forma generalizada como propusieron Hanahan y Weinberg o bien de forma individualizada para cada tipo de neoplasia.

El MU también ha sido motivo de estudio, inicialmente buscando factores pronósticos tanto a nivel histológico, como a nivel citogenético y molecular tratando de identificar aquellos casos que van a desarrollar metástasis. Posteriormente, se han estudiado qué vías de señalización están implicadas en su desarrollo y evolución y finalmente tratando de descubrir posibles dianas terapéuticas para poder ser utilizadas en el contexto de una terapia sistémica.

En esta dirección, unas de las vías de señalización más estudiadas han sido las de MAPK y PI3K-AKT-mTOR. Estas vías se han visto alteradas en los procesos tumorales y en concreto en MU se encuentran constitutivamente activas, y se han visto involucradas en su desarrollo a través de múltiples mecanismos (que son a su vez diferentes a los descritos en melanoma cutáneo). Ambas participan y convergen en los procesos de traducción de proteínas CAP dependiente.

Ya que tanto el melanocito uveal como el de la piel derivan igualmente de la cresta neural es razonable pensar que las vías de MAPK y PI3K-AKT-mTOR regulen la síntesis de proteínas en el MU de la misma manera que en el melanoma cutáneo. Las proteínas implicadas en las rutas de señalización de ambas vías, así como las proteínas involucradas en la traducción proteica CAP dependiente también podrían encontrarse desreguladas en la patogénesis molecular del MU. Por lo tanto, el estudio detallado de estas vías permitiría conocer nuevos factores pronósticos y/o nuevas proteínas “principales” susceptibles a ser moduladas mediante fármacos con el fin de conseguir nuevos abordajes terapéuticos en el MU.

V. OBJETIVOS

V. OBJETIVOS

1. Estudio de las vías de señalización MAPK y PI3K-AKT- mTOR y de las proteínas implicadas en la traducción proteica dependiente de CAP (EIF-4E, 4E-BP1), en una serie de pacientes de melanoma uveal.
2. Estudio de marcadores de ciclo celular (Ki67 y P16) en una serie de pacientes de melanoma uveal.
3. Correlacionar los resultados con los datos clínico-patológicos y el seguimiento de los casos-pacientes seleccionados para evaluar si las vías de señalización estudiadas, pueden ser marcadores pronósticos.
4. Estudio de nuevos abordajes farmacológicos basados en la combinación de inhibidores de tirosina quinasa de las vías de señalización estudiadas en modelos *in vitro* de líneas celulares de melanoma uveal.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Características clínico-patológicas y seguimiento/evolución

Los datos clínico-patológicos y el seguimiento clínico fueron recogidos de las historias clínicas y los archivos del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH), servicio de Anatomía Patológica del Instituto Universitario Dexeus (IUD) y del Instituto de Microcirugía Ocular (IMO). Todos estos centros están localizados en Barcelona (España). La recogida de datos y de muestras fue siguiendo la normativa del comité de ética de cada institución y cumpliendo con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

Se identificaron 101 pacientes diagnosticados de MU entre 1997 y 2012, de una búsqueda realizada de los archivos de los servicios de Anatomía Patológica del HUVH y IUD. Los bloques de los tejidos parafinados se obtuvieron del Biobanco (banco de tumores) del HUVH (55 casos) y del Servicio de Anatomía Patológica del IUD (46 casos), de melanomas uveales sometidos a enucleación. La selección de las muestras tisulares fue en base a que tuvieran suficiente excedente de tejido tumoral después del diagnóstico.

Se realizó un nuevo corte para hematoxilina-eosina (HE) de cada tumor y todos los casos fueron reevaluados y clasificados según la clasificación modificada de Callender (Armed Forces Institute Pathology classification) (38) y estadiados según la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (39). Ninguno de los pacientes recibió ningún tratamiento previo a la cirugía. En el momento del diagnóstico no había evidencia alguna de invasión ganglionar ni/o de metástasis a distancia.

Los datos clínicos como edad, sexo, lateralidad, localización y tamaño se obtuvieron de la historia clínica y de los informes anatómo-patológicos.

Los datos de seguimiento y evolución fueron extraídos de las notas escritas por los médicos oftalmólogos y oncólogos en las historias clínicas de cada paciente, del HUVH i del IMO.

2. Creación de Matrices de Tejido (TMA)

Los TMA (tissue microarrays) son matrices de tejido que permiten la realización y análisis de técnicas complementarias tales como la IHQ en muestras de tejido procedentes de muchos tumores de distintos pacientes de forma simultánea.

Para su elaboración, en este estudio, el patólogo seleccionó el área de tejido tumoral a analizar en la laminilla de HE. Posteriormente el técnico de anatomía patológica localizó dicha área en el bloque tisular de parafina correspondiente a la laminilla analizada. De los bloques de tejido se extrajeron los cilindros de 0.8mm, de las áreas seleccionadas, por perforación para introducirlos en un bloque receptor en el cual quedaron representados todos los tumores.

Se elaboraron los TMA con aparato semiautomático (Advanced-Tissue-Arrayer). Una vez realizados los nuevos bloques, mediante los microtomos se realizaron cortes de 2-3µm para poner en los portaobjetos y poder realizar las técnicas de IHQ.

3. Procesado inmunohistoquímico

El estudio IHQ se hizo en 101 casos de tejido fijado en formol y posteriormente parafinado. Para los anticuerpos 4E-BP1, p4E-BP1, EIF4E, pEIF4E, pEIF4G, Ki67 y P16 se utilizó una sección entera de tejido, mientras que para los anticuerpos pS6, pMAPK y HER3 se utilizaron muestras incluidas en matrices de tejido (TMA).

Los anticuerpos 4E-BP1, p4E-BP1, pS6, pMAPK, Eif4E, pEIF4E, pEIF4G, Ki67 y P16 se realizaron según el método de tinción Benchmark XT utilizando el kit *ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection* (Ventana Medical Systems), basado en un sistema indirecto sin biotina para detectar los anticuerpos primarios de IgG y IgM de ratón y de conejo.

Los cortes de tejido se realizaron a 2-3 µm de grosor en cada caso y fueron incubados una hora a 60°C para una mejor adhesión de estos en el porta-objetos.

El método de tinción Benchmark XT utiliza su propio sistema automático. Cada paso tiene un tiempo y una temperatura de incubación definidos.

Los cortes fueron desparafinados en la solución EZ prep™ (10x) y el acondicionamiento celular se hizo con Cell Conditioning 1, pre-diluido a pH8. Una vez hecho el acondicionamiento celular a pH8, las muestras fueron fijadas con

peróxido de hidrógeno al 3%. Los anticuerpos primarios específicos fueron diluidos e incubados como se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpos primarios específicos

Anticuerpo	Origen	Compañía	Dilución	Tiempo de incubación
4E-BP1	Rabbit polyclonal	Cell Signaling	1/40	1 hora
p4E-BP1	Rabbit polyclonal	Cell Signaling	1/25	32 minutos
pS6rb	Rabbit polyclonal	Cell Signaling	1/100	32 minutos
pMapk (clone Thr202/tr204)	Rabbit polyclonal	Cell Signaling	1/200	1 hora
eiF4E	Rabbit polyclonal	Cell Signaling	1/75	1 hora
peiF4G	Rabbit polyclonal	Cell Signaling	1/10	1 hora y 20 minutos
peiF4E (clone EP2151Y)	Rabbit polyclonal	Abcam	1/200	1 hora
Ki 67 (clone 30-9)	Rabbit monoclonal	Ventana Medical System	predilución	16 minutos
P16 (clone E6H4)	Mouse monoclonal	Ventana Medical System	predilución	20 minutos
BAP1	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, INC	1/50	50 minutos
Her3	Mouse monoclonal	Atanasio	1/75	1 hora y 20 minutos

Los anticuerpos primarios se detectaron con un anticuerpo secundario marcado con una enzima, el complejo se visualizó utilizando Fast Red A/B Naphtol. Los cortes se lavaron con agua destilada y fueron contra-teñidos con hematoxilina, deshidratados y montados con medio permanente.

Los controles negativos, sin anticuerpos primarios, fueron utilizados para garantizar la especificidad del proceso de tinción.

4. Evaluación inmunohistoquímica

Un observador evaluó la expresión inmunohistoquímica, en las células tumorales, de cada anticuerpo. La inmunoreactividad fue analizada según el grado de intensidad

de tinción (como 0: ausencia de tinción, 1+ tinción débil, 2+ tinción intermedia y 3+ tinción intensa) tanto a nivel nuclear como citoplasmático (ver figura 29).

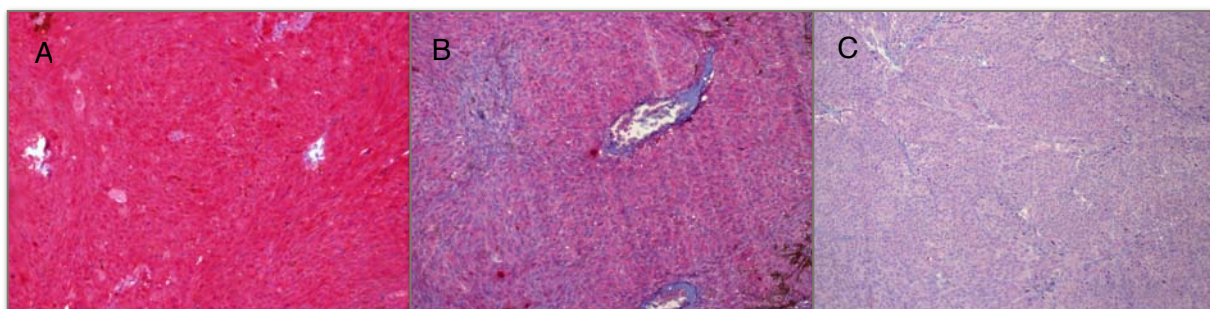


Figura. 29 Grado de intensidad de la tinción. A: grado 3+, B: grado 2+, C: grado 1+. Fotos del autor.

5. Líneas celulares y cultivo celular

Las líneas celulares originales para este estudio fueron MKTBR, OCM1 (líneas celulares de MU humano) y UW1 (línea celular de melanocito uveal humano transformado). La línea celular MKTBR fue establecida por el Dr. Belkhou (CJF INSERM, Francia) y el Dr. Albert (Universidad de Wisconsin-Madison, EUA) estableció las líneas OCM-1 y UW-1. Su mantenimiento ha sido a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 90% (ver tabla 10).

Tabla 10. líneas celulares empleadas, cedidas por la Dra. Pilar Martín Duque (Universidad Francisco Vitoria. Madrid).

Línea celular	Organismo	Origen	Medio de cultivo
MKTBR	humano	melanoma uveal	RPMI
OCM1	humano	melanoma uveal	RPMI
UW1	humano	melanocito uveal	RPMI

Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) con L-Glutamina (Biowest) que se complementó con el 10% de suero bovino fetal (Biowest) y antibiótico, penicilina/sterptomycin/amfotericina 1% (Lonza). Las células fueron sembradas en monocapa en placas *petri* para cultivo de 56.7

cm2, Nunclon Delta, tratadas por Thermo Scientific. Se observó su crecimiento normal cada día con el microscopio de contraste de fase invertida (LEICA DMIL).

Los cultivos se hicieron crecer hasta el 90% de confluencia y fueron mantenidos en el tiempo realizando diferentes pases mediante tratamiento con tripsina y EDTA (Lonza) a 37°C. Las células fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer (BRAD counting chamber BLAUBRAND de Sigma Aldrich), (ver figura 30).

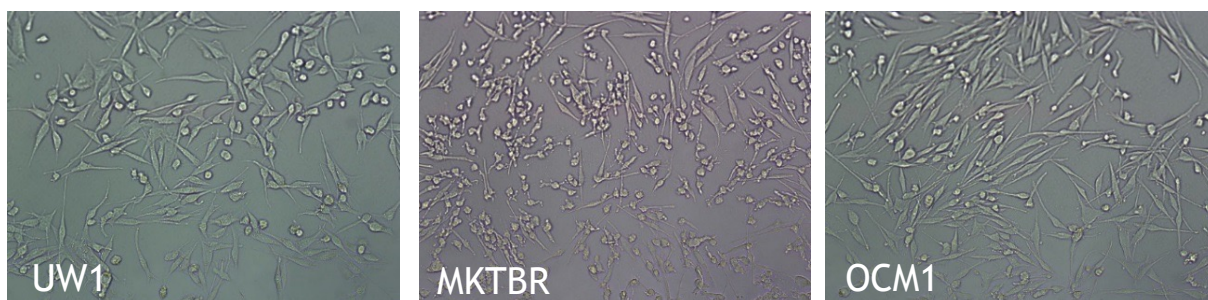


Figura. 30. imagen de los cultivos celulares para cada línea utilizada. Fotos del autor

6. Fármacos

Se disolvieron Dacarbacina (DTIC) (Sigma Aldrich), PP242 (Selleck chemicals) y AZD8330 (Selleck chemicals) en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener soluciones madre de 10 mg/0.1 ml, 10 nM y 50 mM respectivamente. Fueron almacenadas a -20°C.

7. Determinación IC50 de los fármacos

A día 0 se sembraron mil células de cada línea celular en placas de 96 pocillos (TC-plate 96 well standard. F; Sarstedt) y se cultivaron durante 24h. Posteriormente se añadieron los fármacos como agentes únicos, en diferentes concentraciones para lograr conocer la dosis de IC50 de cada uno de ellos (IC50, medida cuantitativa que indica qué cantidad de una sustancia se necesita para inhibir al 50% un proceso biológico o bioquímico determinado). Las dosis empleadas de cada fármaco en las diferentes líneas celulares están reflejadas en la figura 31.

La viabilidad celular se midió en el día 6 después de cinco días de tratamiento con el test de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Finalmente los resultados se leyeron mediante un espectrofotómetro a 590 nm. Los experimentos se repitieron al menos hasta conseguir por duplicado la IC50 para cada fármaco y línea celular de forma independiente. La IC50 se determinó utilizando la concentración probada que causa el efecto más cercano al 50% de toxicidad.

		Drugs	Concentrations
Series of drug concentrations tested in MTTs	IC50 determinations	DTIC	10, 20, 50, 100, 150 and 200 µg/ml
		PP242	0,15625; 0,3125; 0,626; 1,25; 2,5 and 5 µm
		AZD8330	0,4375; 0,875; 1,75; 3,5; 7 and 14 nM
	Drug combination assays	DTIC	IC50 x1/16, x1/8, x1/4, x1/2, x1 and x2
		PP242	
		AZD8330	
		DTIC+PP242	
		DTIC+AZD8330	
		PP242+AZD8330	
	DTIC+PP242+AZD8330		

Figura. 31. Concentraciones para cada fármaco y cada línea celular.

MTT es un colorante de tetrazolio amarillo capaz de ser reducido a su forma insoluble, que tiene color púrpura, por enzimas celulares óxido-reductoras dependientes de NAD(P)H. El principio del test de MTT es que estas enzimas pueden reflejar la actividad metabólica celular y consecuentemente ser utilizadas como indicador del número de células viables presentes en el pocillo. A mayor producción de formazan (producto-color obtenido de la reacción de MTT) mayor número de células viables y más púrpura aparece el pocillo.

En este trabajo, para el test de MTT, se ha utilizado DMSO como disolvente de formazan púrpura que se ha formado después de 3 horas de incubar las células con MTT (ver figura 32).

Cell viability screen. MTT

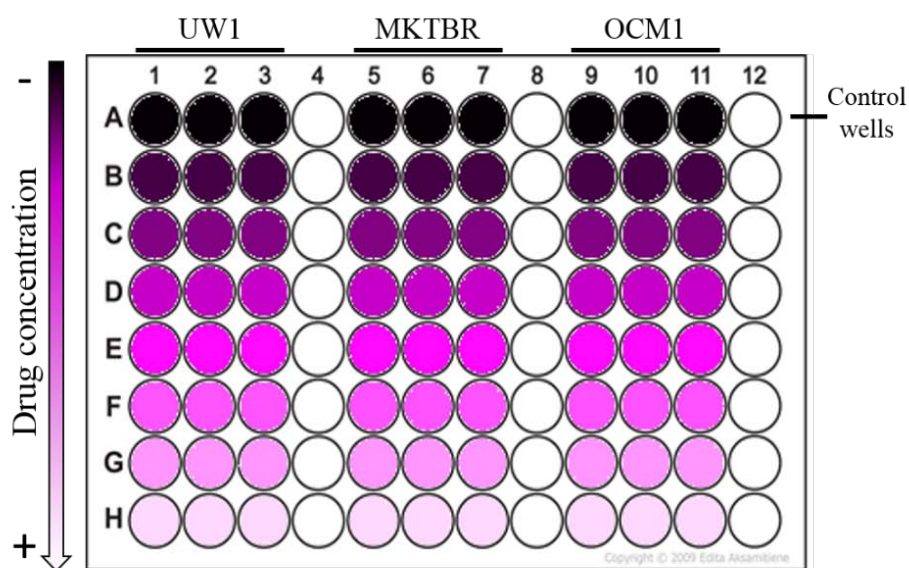


Figura 32. Esquema representativo del diseño para el ensayo MTT.

8. Ensayos de viabilidad celular frente a la adicción de fármacos

Para valorar de el efecto combinado de los fármacos se plantaron mil células de cada línea celular en placas de 96 pocillos (TC-plate 96 well standard, F. Sarstedt) y se cultivaron durante toda la noche. A las 24 horas se añadieron los fármacos como agentes únicos o combinados. Para la determinación de los efectos combinados se mezclaron los agentes como se detalla a continuación. Se procedió a obtener una mezcla de fármacos correspondiente al doble de la cantidad de IC50 de cada uno de ellos de manera independiente en cada línea celular, (stock 2x) y posteriormente se realizaron una serie de diluciones 1/2 hasta lograr una dilución final de 1/16 (ver figura 6.2). Se utilizó DMSO como control. Pasados 5 días de tratamiento se efectuaron los ensayos de MTT utilizando DMSO como disolvente del formazan violeta una vez formado, después de 3 horas de incubación de las células en MTT al 10%. Los resultados fueron valorados mediante lectura con espectrofotómetro a 590nm. Todos los experimentos (tanto en fármacos administrados de manera única como en los administrados de manera combinada) se repitieron al menos dos veces

de forma independiente. Los efectos de la combinación de fármacos se calcularon según el análisis del efecto medio de Chou-Talalay y determinado con el índice de combinación (CI) (158, 159). Las dosis de los fármacos y sus valores de efectos de manera independiente o en combinación se utilizaron para determinar si la interacción era sinérgica ($CI < 1$), aditiva ($CI = 1$) o antagónica ($CI > 1$) y se calcularon mediante el software CalcuSyn v. 2.1 (Biosoft Inc).

9. Ensayo de formación de colonias de la combinación de fármacos

Se sembraron mil células en placas *petri* de 56.7 cm² para cultivo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 90% para la formación de colonias. A las 24 horas las placas se trataron con cada uno de los fármacos y sus combinaciones a la dosis de IC₅₀. Cinco días después del tratamiento el medio de cultivo se cambió. A los diez días de los tratamientos las placas se lavaron con solución Buffer fosfato 1% (PBS) y las unidades formadoras de colonias (CFU) se tiñeron con cristal de violeta durante 1 hora. El exceso de cristal de violeta se lavó con agua, después las placas se secaron para la visualización y conteo de las colonias. Estos ensayos solamente se hicieron una vez. El recuento de CFU y las medidas del tamaño medio de las CFU se hicieron con el "analyse particles tool" de ImageJ (Fiji Versión 1.48v).

10. Curvas de crecimiento. Nivel de duplicación de la población

Las curvas de crecimiento se determinaron mediante los análisis de niveles de duplicación de la población acumulada (NDP), representado por la suma de la duplicación de la población (DP) de los pasajes anteriores. La DP, para cada línea celular se obtuvo según la siguiente fórmula: $DP = \text{Log}(N_f/N_i) / \text{Log}2$, en donde N_f es el número de células contadas antes de cada paso y N_i es el número de células sembradas.

Para obtener la DP las células fueron contadas y sembradas cada dos días en una densidad poblacional de 3×10^5 células (N_i) en placas *petri* para cultivo de 56.7 cm²

Nunclon Delta tratados, de Thermo Scientific. Las DP fueron determinadas por duplicado y las curvas de NDP se realizaron al menos dos veces con un total de tres DP.

11. Ensayo de migración celular in vitro. Wound healing.

En los ensayos de migración celular realizados en las líneas celulares de MU se basaron en generar una separación entre las células para después medir el grado de unión de las mismas. Las células de las diferentes líneas celulares fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos, Nucleon Delta tratadas, de Thermo Scientific, permitiendo que crecieran hasta la confluencia. Después las células fueron separadas utilizando una punta de pipeta de 1000 µl estéril, para inducir una brecha entre ellas. Las placas se fotografiaron inmediatamente después del rascado, a las 24 y a las 48 horas en la misma localización. El experimento se realizó dos veces.

12. Análisis descriptivo y estadístico

Para el análisis descriptivo se realizaron tablas de frecuencia en las variables categóricas o de tipo nominal, y se calcularon medidas de tendencia central y dispersión cuando las variables eran numéricas. Los valores de variables numéricas cuya distribución no era aproximadamente normal se expresaron como mediana (rango intercuartílico).

El análisis estadístico se hizo mediante el software SPSS Statistics versión 23.0.

Se realizó un análisis de supervivencia para calcular las tasas libres de metástasis y de mortalidad acumulada durante el tiempo de seguimiento y se realizaron curvas de Kaplan-Meier, utilizándose el Log-Rank como estadístico de contraste, para efectuar comparaciones con las características basales de los pacientes y los diferentes marcadores; las comparaciones con variables numéricas se evaluaron mediante modelos de regresión de Cox simple. Además, en estas variables numéricas, se utilizaron curvas ROC para establecer aquellos puntos de corte con mejor sensibilidad y especificidad para predecir la aparición de metástasis y la mortalidad.

Se realizaron análisis multivariantes mediante modelos de regresión de Cox múltiple para determinar las variables predictoras independientes de mortalidad y de mayor riesgo de metástasis durante el seguimiento. Para cada una de las variables respuesta, se realizaron tres modelos: en un modelo se tenían en cuenta sólo variables clínicas, en otro sólo marcadores y en otro el conjunto de variables clínicas y marcadores asociados de forma estadísticamente significativa en el análisis bivariante. Los riesgos de cada una de las variables predictoras en los modelos multivariantes se expresaron en Hazard Ratio (HR), o razón de riesgos, con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (ic 95%).

La comparación entre marcadores y variables clínicas se realizó mediante el test ji-cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher en variables categóricas, el test ji-cuadrado de tendencia lineal en variables ordinales, el coeficiente de correlación de Spearman en la comparación entre variables numéricas y la prueba de la U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis cuando se compararon variables numéricas entre variables de dos o más grupos respectivamente.

Se consideró estadísticamente significativo un p-valor inferior a 0.05.

13. Análisis exploratorio de datos

Se realizó un proceso de análisis exploratorio de datos con el software de AutoDiscovery (*Butler Scientifics*, www.butlerscientifics.com).

AutoDiscovery evaluó los coeficientes de correlación de rangos de Spearman (ρ) para cada pareja de variables numéricas, análisis de varianza para cada pareja de variables de respuesta del factor numérico cualitativos y coeficientes V de contingencia de Cramer (ϕ) para cada pareja de variables cualitativas dentro de los datos consolidados fijados con la finalidad de extraer las relaciones más importantes entre las variables.

El análisis de varianzas con variables numéricas que siguen una distribución normal (test de Jarque-Bera) se realizó con “one-way ANOVA”. Cuando la variable numérica no se distribuye de forma normal, se realizaron los tests de Mann-Whitney (para 2 categorías) y el de Kruskal-Wallis (para más de 2 categorías).

Solamente fueron consideradas las siguientes relaciones:

* Correlaciones evaluadas con $n \geq 5$, significancia $p < 0,05$ (two-tailed) y $\rho \geq 0,8$

- * Análisis de varianzas evaluadas con $n \geq 5$
- * Contingencias evaluadas con $n \geq 5$ y $n \leq 100$, $p < 0,05$ (test de Xi cuadrado) y $\phi \geq 0,6$
- * Contingencias evaluadas con $n > 100$, $p < 0,05$ (test de Xi cuadrado) y $\phi \geq 0,3$

Las relaciones restantes fueron rechazadas de forma automática por el software.

Este proceso fue sistemáticamente ejecutado para cada uno de los grupos de riesgo de la población (variables cualitativas del conjunto de datos) para identificar potenciales relaciones asociadas a grupos de riesgo en particular.

Dada la naturaleza exploratoria y el objetivo de este análisis, no se aplicaron métodos de corrección de la significación (ej. Bonferroni).

VII. RESULTADOS

VII. RESULTADOS

1. Datos clínico-patológicos y seguimiento. Análisis descriptivo.

La relación de todos los datos clínicos se detalla en la tabla 11. De una muestra de 101 casos, la representación entre sexos era más o menos equitativa ya que el 51,5% correspondían a mujeres y el 48,5% a hombres. La edad media de la muestra al diagnóstico era de 60,5 años variando entre 24 el más joven y 90 el más añoso. En cuanto a la lateralidad en el 47,5% de los casos la tumoración asentaba sobre el ojo derecho y en el 31,7% en el izquierdo. En el 96,1% de los casos de nuestra serie los melanomas eran de localización posterior (84,2% en coroides y 11,9% en cuerpo ciliar), en el 2% de localización puramente anterior, en el iris. La afectación era panuveal en el 2%. En cuanto al tamaño se calculó el volumen de los tumores con las dimensiones de los mismos, en milímetros cúbicos (mm³). En nuestra serie el volumen tumoral oscilaba entre 15 mm³ el menor y 456 mm³ el mayor y la mediana fue 96 mm³.

Tabla 11. Datos clínicos

Sexo	Hombres: 49 Mujeres: 52	
Edad al diagnóstico	Media: 60.5 Mediana: 62	Rango: 24-90
Lateralidad	Derecho: 48 Izquierda: 32 Desconocido: 21	
Localización	Iris: 02 Cuerpo ciliar: 12 Coroides: 85 Uvea: 02	
Volumen (mm ³)	Media: 107,02 Mediana: 96	Rango: 15-456

La evaluación histológica se hizo mediante microscopía óptica en un corte de cada tumor teñido con HE con la finalidad de valorar los parámetros descritos como pronósticos, detallados en la introducción, así como otros cuyos resultados se detallan en la tabla 12.

En todos ellos se valoró el histotipo tumoral según la clasificación de Callender modificada pero se determinó en <10% de células epitelioideas necesarias para el tipo mixto, en >10% para el epitelioide, siendo 0% para el fusiforme (en nuestra serie 28.7%, 44.6% y 26.7% respectivamente). Las mitosis se contaron en diez CGA para cada corte. En cuanto al infiltrado inflamatorio se valoró la cantidad de linfocitos asociados al tumor según tres categorías, ausente (31%), leve (47%) intenso (22%). Referente al patrón de neovascularización se estableció como patrón “Leve” la presencia de ocasionales vasos aislados de pared fina dentro del tumor (19%); patrón “Moderado” la presencia intratumoral de vasos de pared engrosada, rígidos y aislados (46%) y como patrón “Intenso” se consideró la presencia de ambos tipos de vasos con disposición en paralelo y entrelazados (35%). La pigmentación se valoró sobre el corte histológico y no macroscópicamente, se estableció como “Leve” los casos sin pigmento o con pigmentación suave que permitía ver el detalle celular (59,4%); “Moderada” los casos con abundante pigmentación pero que en la mayoría de la superficie tumoral permitía observar el detalle celular (22,8%) e “Intensa” en aquellos que presentaban una pigmentación tan abundante que no permitía ver el detalle celular o dificultaba globalmente la valoración del mismo excepto en algunas áreas (17,8%). Hubo un caso cuya pigmentación era tan intensa que no permitió el conteo de mitosis, la valoración del infiltrado inflamatorio ni el patrón de vascularización. En cada tumor se calculó el porcentaje de necrosis respecto al total del tejido tumoral y posteriormente se categorizó en 3 categorías: ausencia (0%), leve (<30%) y moderada (>=30%) cuyos resultados han sido 70,3%, 20,8% y 8,9% respectivamente.

En los casos en donde los cortes histológicos incluían representación del nervio óptico (76 casos) se pudo valorar la presencia o no de invasión tumoral de los cuales se confirmó en 15 de ellos (19,7% de los casos valorables). El estado de la retina suprayacente al tumor no se pudo valorar solamente en 2 casos. En el conjunto de los casos valorables, en el 30,3% la retina estaba respetada, en el 11,1% infiltrada

(presencia de células de MU dentro del grosor de las capas de la retina) sin llegar a estar rota y en el 58,6% se evidenciaba una solución de continuidad provocada por el tumor. La presencia o no de retina desprendida no se valoró. La invasión de la esclera y de los tejidos orbitarios circundantes se valoró tal como se detalla en la tabla 12.

Según las dimensiones del tumor, el estado de los ganglios y la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, se clasificaron todos los casos acorde con la clasificación TNM de la AJCC (39) cuyos resultados se especifican en la tabla 12.

Tabla 12. Datos Histológicos

Tipo celular:	Fusiforame: 27 Mixto: 29 Epitelioide: 45	
Mitosis/10 CGA:	Media: 2.47 Mediana: 01	Rango: 0-19
Infiltrado inflamatorio limfocitario:	Ausente: 31 Leve: 47 Intenso: 22 No valorable: 01	
Patrón de Neovascularización:	Leve: 19 Moderado: 46 Intenso: 35 No valorable: 01	
Pigmentación:	Leve: 60 Moderada: 23 Intensa: 18	
Necrosis	Ausencia: 71 Leve: 21 Moderada: 09	
Retina suprayacente al tumor:	Respetada: 30 Infiltrada: 11 Rota: 58 No valorable: 02	
Invasión Esclera:	Presente: 74 Ausente: 27	
Invasión Órbita:	Presente: 17 Ausente: 79 No valorable: 05	

Invasión del Nervio Óptico:	Presente: 15 Ausente: 61 No valorable: 25
Estadaje al diagnóstico (TNM):	I: 06 IIA: 17 IIB: 11 IIIA: 41 IIIB: 07 IIIC: 19

El seguimiento de los pacientes ha sido posible en 74 casos (73.3% del total de la serie), iniciándose el día de la intervención quirúrgica (exéresis tumoral) con una media de 6.44 años (0.10-16.87 años). Del total de pacientes con seguimiento conocido 30 casos han desarrollado metástasis (40.5%) cuyas localizaciones se especifican en la tabla 13. En referencia a la evolución de los 74 casos, en el grupo de los pacientes fallecidos (43.2%) el 31.1% murieron a causa del tumor (MU) y los que murieron por otras causas representan el 12.2%. En el grupo de pacientes activos (56.8%), el 9.5% presenta metástasis a distancia mientras que en el resto, 47.3%, no hay evidencia de ellas. Se detallan los resultados en la tabla 13.

Tabla 13. Datos de seguimiento

Seguimiento en 74 casos (días):	Media: 2352,04 Mediana: 2030,50	Rango:36-6156
Metástasis (MTX):	Si: 30 No: 44 Desconocido: 27	
Número de MTX:	Únicas: 17 Hígado: 14 Piel: 1 Hueso: 2 Múltiples: 15 Desconocido: 31	
Localización MTX:	Hígado: 25 (83.3%) Hueso: 7 (23.3%) Pulmón: 7 (23.3%) Intestino: 1 (3.3%) Glándula suprarrenal: 2 (6.7%) Cerebro: 3 (10.0%) Partes blandas: 2 (6.7%) Piel: 4 (13.3%) Ganglios linfáticos: 2 (6.7%) Bazo: 1 (3.3%) Ovario: 1 (3.3%)	

Periodo libre de enfermedad en 20 casos (días):	Media: 1226	Rango: 19-3761
Evolución:	Activo: 42 Éxito: 32 Desconocido: 27	
Estado:	*MCE: 23 *MSE: 9 *VCE: 7 *VSE: 35 Desconocido: 27	

(*) MCE: muerte con enfermedad; MSE: muerte sin enfermedad; VCE: vivo con enfermedad; VSE: vivo sin enfermedad.

2. Signaling. Análisis descriptivo

Se han realizado varios marcadores inmunohistoquímicos con la finalidad de valorar la implicación de las vías de MAPK y de mTOR en la biología del MU, estos han sido **HER3, pMAPK, 4EBP1, p4EBP1, EIF4E, pEIF4E, pEIF4G y pS6**, los cuales se han valorado según su intensidad de expresión en nula (0, ausencia de tinción), leve (1+, tinción débil), moderada (2+, tinción intermedia) y alta (3+, tinción intensa) tal y como se detalla en el apartado 3 del capítulo de material y métodos. Existen casos en los que no se ha podido valorar la inmunoreactividad de dichos marcadores por diferentes motivos, entre los cuales la pigmentación intensa es uno de los principales.

A continuación se representan gráficamente los porcentajes de los resultados obtenidos de la expresión IHQ para cada uno de estos marcadores así como la distribución de los resultados valorables en tres categorías según la intensidad de expresión IHQ: *nula-baja*, que incluye los casos sin tinción y los de tinción débil (0 y 1+), *moderada* correspondiente a los casos de tinción intermedia (2+) y *alta* para aquellos de tinción intensa (3+).

HER3:

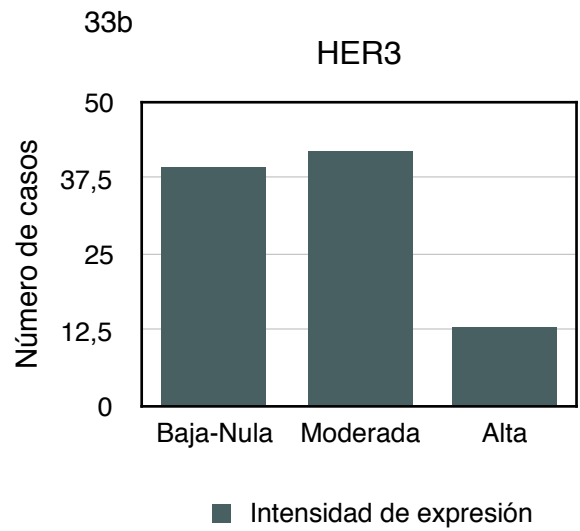
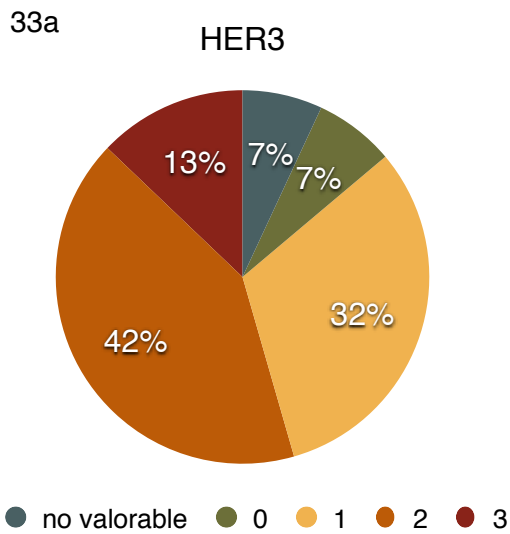


Figura 33. Resultados de la expresión IHQ de HER3; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

pMAPK:

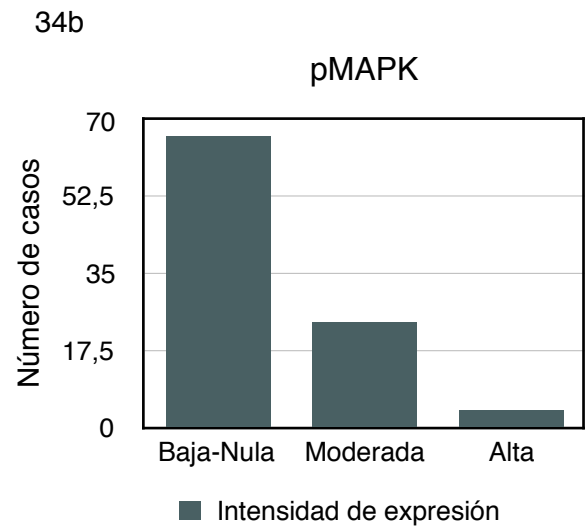
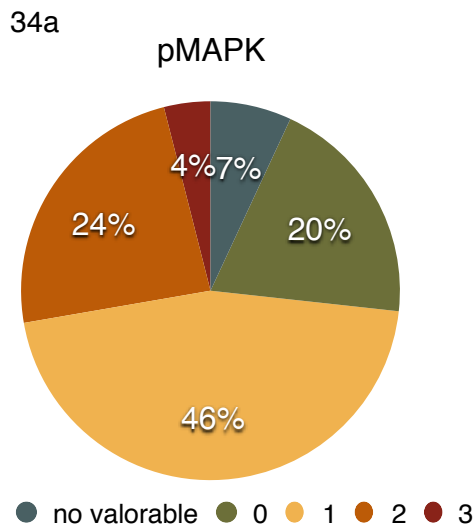
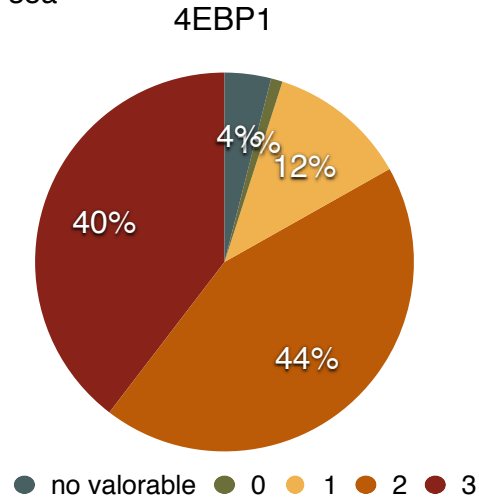


Figura 34. Resultados de la expresión IHQ de pMAPK; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

4E-BP1:

35a



35b

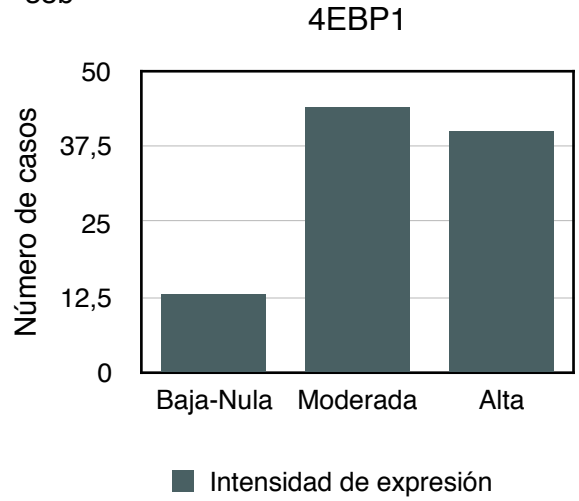
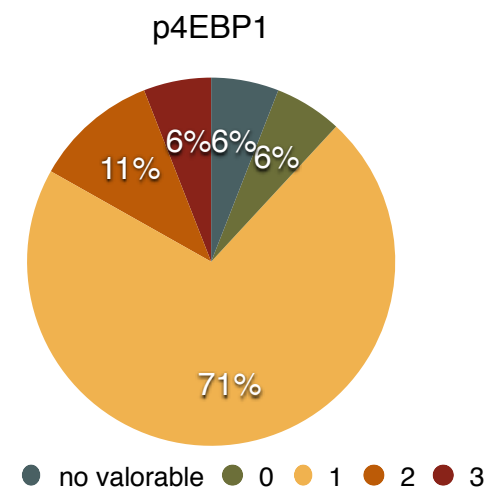


Figura 35. Resultados de la expresión IHQ de 4EBP1; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

p4E-BP1:

36a



36b

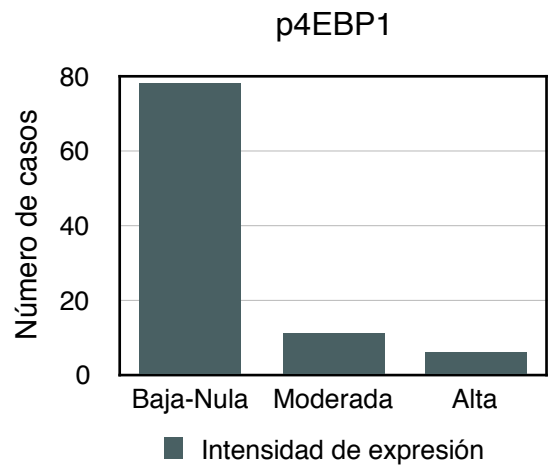


Figura 36. Resultados de la expresión IHQ de p4EBP1; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

EIF4E:

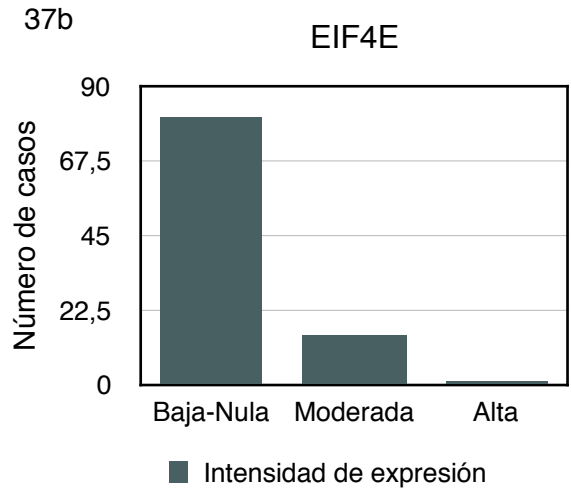
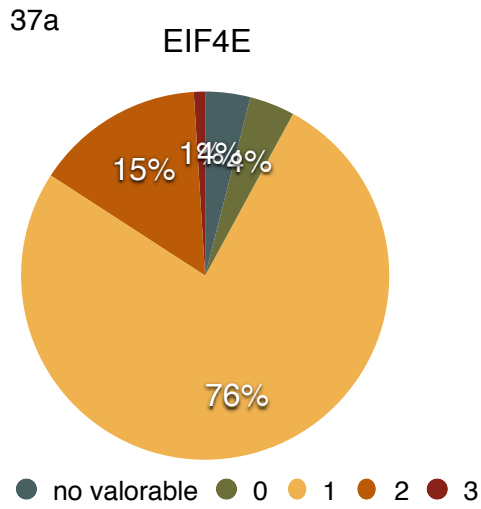


Figura 37. Resultados de la expresión IHQ de EIF4E; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

pEIF4E:

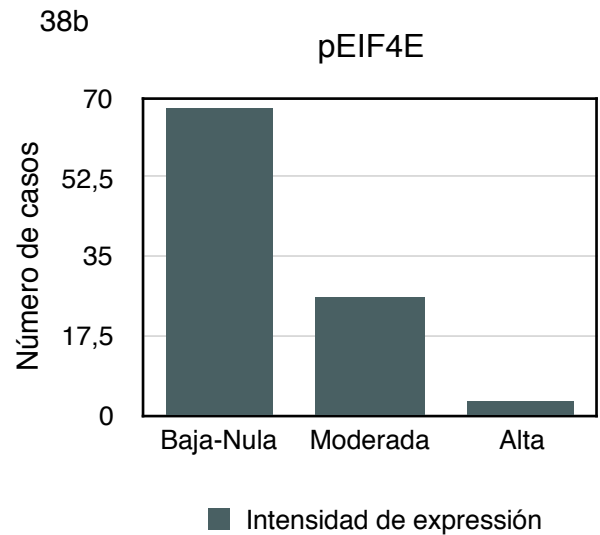
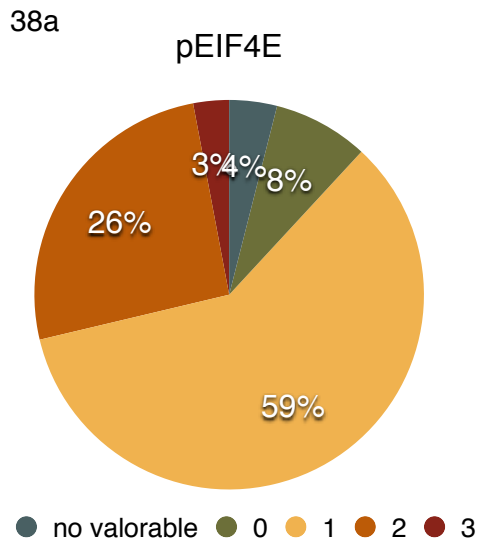
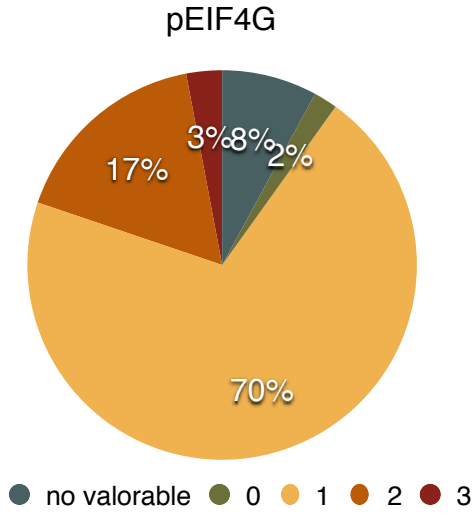


Figura 38. Resultados de la expresión IHQ de pEIF4E; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

pEIF4G:

39a



39b

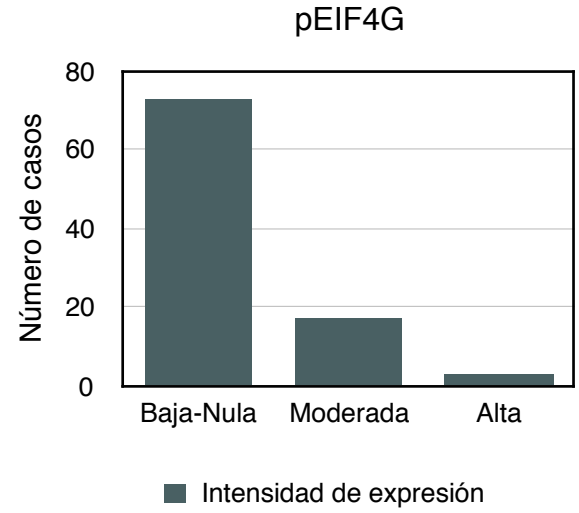
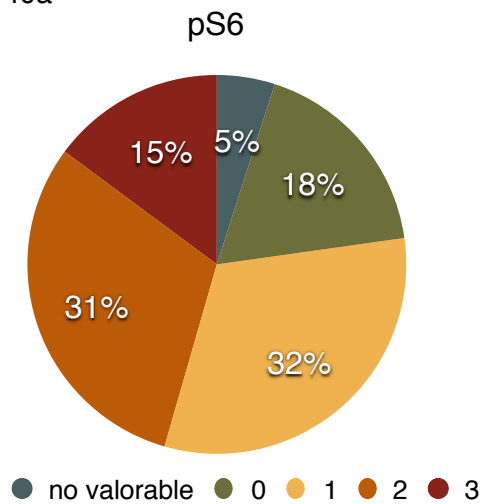


Figura 39. Resultados de la expresión IHQ de pEIF4G; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

pS6:

40a



40b

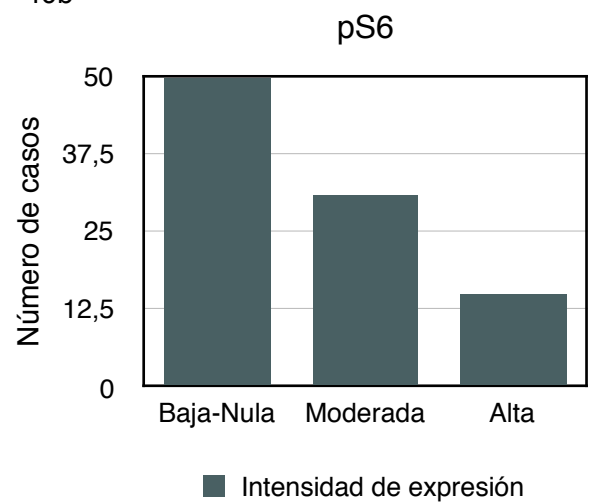
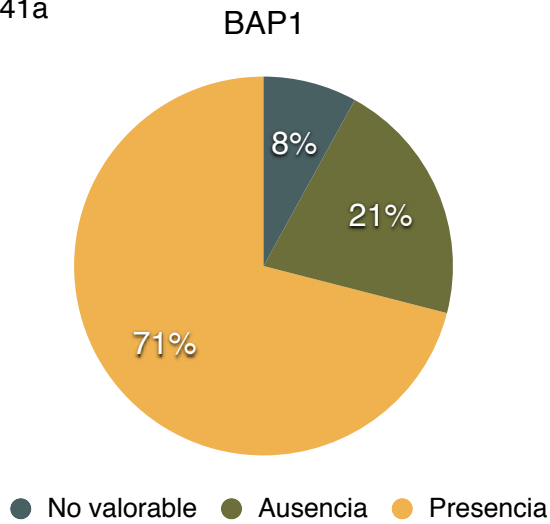


Figura 40. Resultados de la expresión IHQ de pS6(a) de la serie, (b) de los casos valorables.

BAP 1:

41a



41b

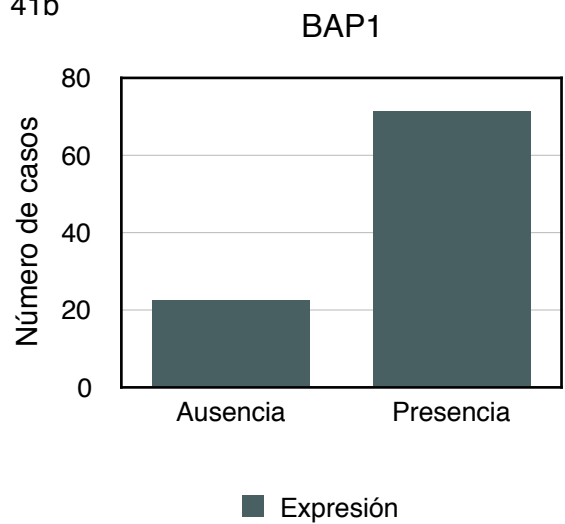
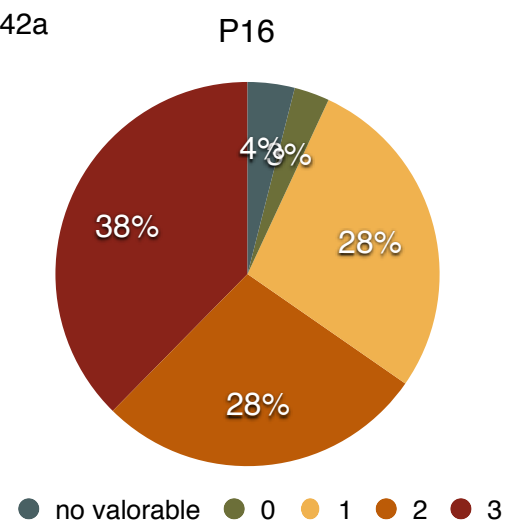


Figura 41. Resultados de la expresión IHQ de BAP1; (a) de la serie, (b) distribución de los resultados de los casos valorables.

P16:

42a



42b

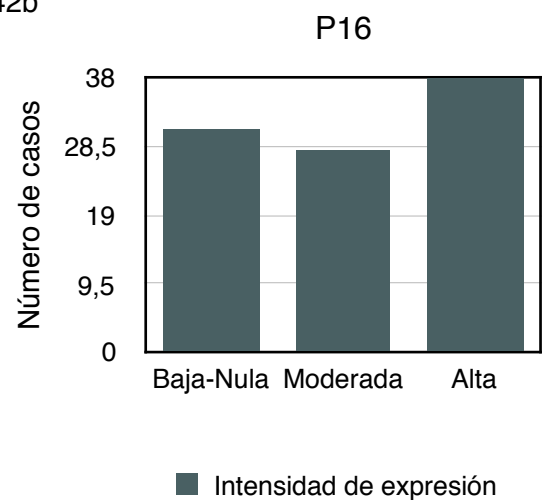


Figura 42. Resultados de la expresión IHQ de P16; (a) de la serie, (b) de los casos valorables.

Ki 67: Para su resultado se han valorado el número de núcleos positivos por campo de gran aumento (CGA) (ver tabla 14).

Tabla 14. Resultado de la valoración de Ki67 por CGA

N	Valorables: 96	No valorables: 5	
Media	18,11		
Rango	Mínimo: 02	Máximo: 75	
Mediana	14,00		
Percentiles	p25: 08,00	p50: 14,00	p75: 22,00

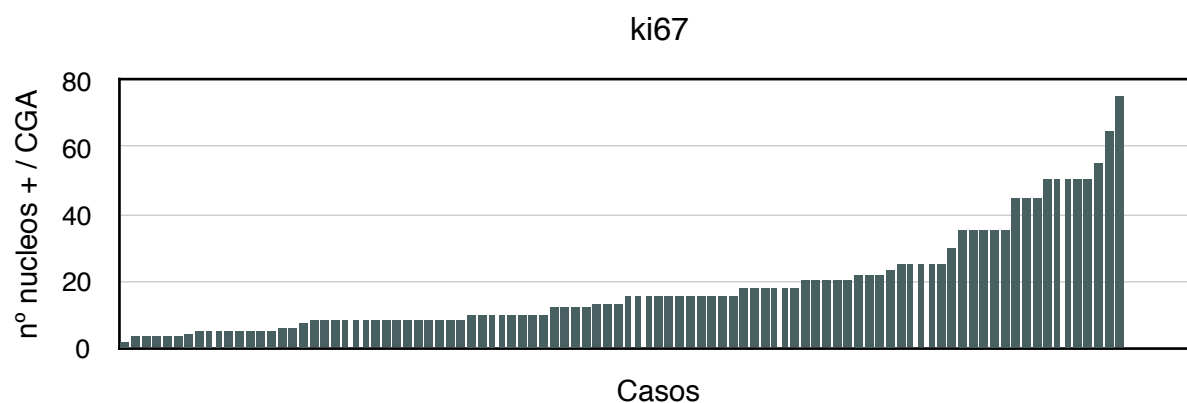


Figura 43. Distribución del número de núcleos positivos/CGA en cada caso.

3. Análisis estadístico

3.1 Marcadores asociados con variables clínicas

Ki67 (**):

- Se correlaciona de forma positiva y significativa con *mitosis* (R (*):0,326; $p=0,001$). Así, obtenemos valores más altos de Ki67 a medida que se incrementan los valores de mitosis. ((*) R : *coeficiente de correlación de Spearman*).

- Los tumores de *histología epiteloides* tienen valores más altos del Ki67 ($p=0,017$). Obtenemos unos valores de Ki67 de 15 (10-34) en histología epiteloides, 11 (6,5-19,5) en histología mixta y 11 (6,5-20) en histología fusiforme.
- Asociado también de forma significativa con *neovascularización* ($p=0,003$). Se obtienen valores más altos de Ki67 en neovascularización intensa, con una mediana de 18 núcleos positivos (10,5-35), más alta que los de neovascularización moderada con valores de 13 (8-23,5) y, a su vez, más alta que la de neovascularización leve, con valores de 8 (5-15).

pMAPK:

- Se asocia de forma significativa con el *volumen* (**), obteniendo valores más altos en aquellos pacientes con una intensidad de expresión de pMAPK bajo ($p=0,020$). Así, en los pacientes con niveles de expresión de pMAPK bajos se obtienen volúmenes de 109 (65-150), en los moderados de 86 (50-105) y en los altos de 41 (38-69).

pS6:

- Se asocia de forma significativa con el *volumen* (**), obteniendo igualmente valores más altos en aquellos pacientes con una intensidad de expresión de pS6 bajo ($p=0,034$). Así, en los pacientes con pS6 bajos se obtienen volúmenes de 114 (89-150), en los moderados de 72 (42-150) y en los altos de 65 (40-126).

4E-BP1:

- Se asocia de forma significativa con el *volumen* (**), obteniendo valores más bajos en aquellos pacientes con una intensidad de expresión de 4E-BP1 alta ($p<0,001$). Así, en los pacientes con 4E-BP1 bajos se obtienen volúmenes de 110 (45-193), en los moderados de 118 (90-152) y en los altos de 61,5 (42,5-94,5).
- Se asocia de forma significativa con la *histología* ($p=0,025$). Así, el 84,6% de los pacientes con intensidad de expresión de 4E-BP1 baja son de histología epiteloides, mientras que sólo son epiteloides el 40,9% de los moderados y el 30,5% de los altos.

P16:

- Los pacientes con una intensidad de expresión de P16 moderada o baja, se asocian de forma significativa con un *infiltrado inflamatorio intenso* ($p=0,005$). Así, el 25% de los pacientes con P16 moderado o bajo son de infiltrado intenso, mientras que de los pacientes con P16 alto, no hay ninguno (0%) con infiltrado intenso.

(**) Los valores del Ki67 y el volumen están aquí expresados en mediana (rango intercuartílico), ya que son variables cuya distribución no se aproxima a la normal.

3.2. Análisis de periodo libre de enfermedad (libre de metástasis)

Hay 74 pacientes de los que disponemos de datos de seguimiento en lo que a metástasis se refiere. De ellos, hay un total de 30 pacientes a los que se les ha detectado metástasis.

El tiempo medio estimado libre de metástasis es de 3764 días (ic 95%: 3142-4386), con supervivencias estimadas libres de metástasis a diferentes años de: 1º año: 93,1% (e.e. 3%), 2º año: 87,5% (3,9%), 3º año: 82% (4,5%), 5º año: 68,8% (5,7%), 10º año: 56% (6,7%), 15º año: 45,5% (7,7%), (ver figura 44).

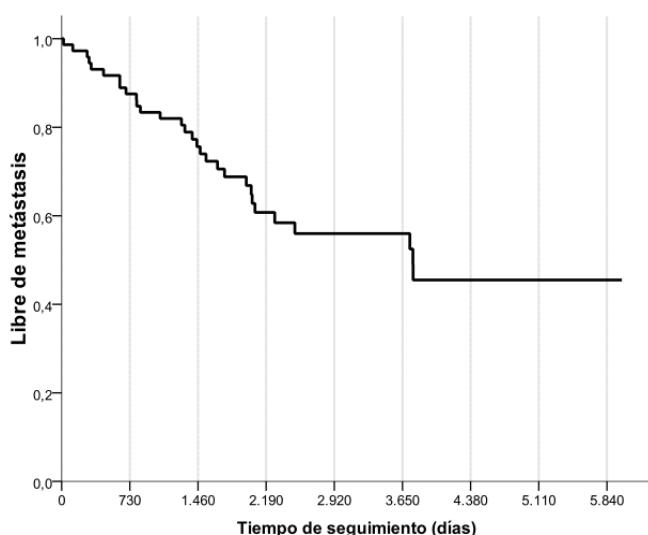


Figura 44: curva de supervivencia libre de metástasis

3.2.1. Comparación variables clínicas

Sexo: no influye en la aparición de metástasis ($p=0,538$)

Edad: sí hay una tendencia a la aparición de metástasis con la edad ($p=0,055$), de la cual se ha hallado un punto de corte (>48 años) a partir del cual el riesgo de metástasis es muy superior ($p=0,003$), (ver figura 45).

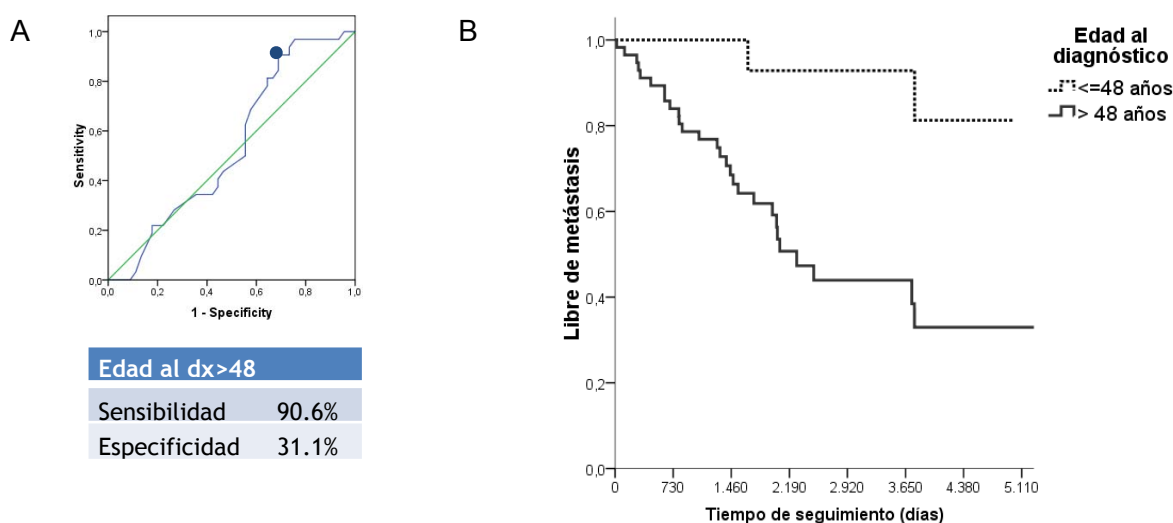


Figura 45. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de metástasis según edad.

Así, el tiempo medio estimado libre de metástasis es de 4617 días (ic 95%: 4114-5119) en aquellos con edades ≤ 48 años, muy superior a los que son mayores de 48 años con un tiempo medio libre de metástasis de 3171 días (ic 95%: 2454-3887). La supervivencia estimada libre de metástasis a los 10 años en edades ≤ 48 años es del 92,9%, mucho más alta que la de los pacientes mayores de 48 años, que es del 43,9%.

Volumen: se asocia de forma estadísticamente significativa a un mayor riesgo de metástasis ($p<0,001$). Hemos hallado un punto de corte óptimo (volumen >100) a partir del cual hay un mayor riesgo de metástasis. Se observa en la figura 46.

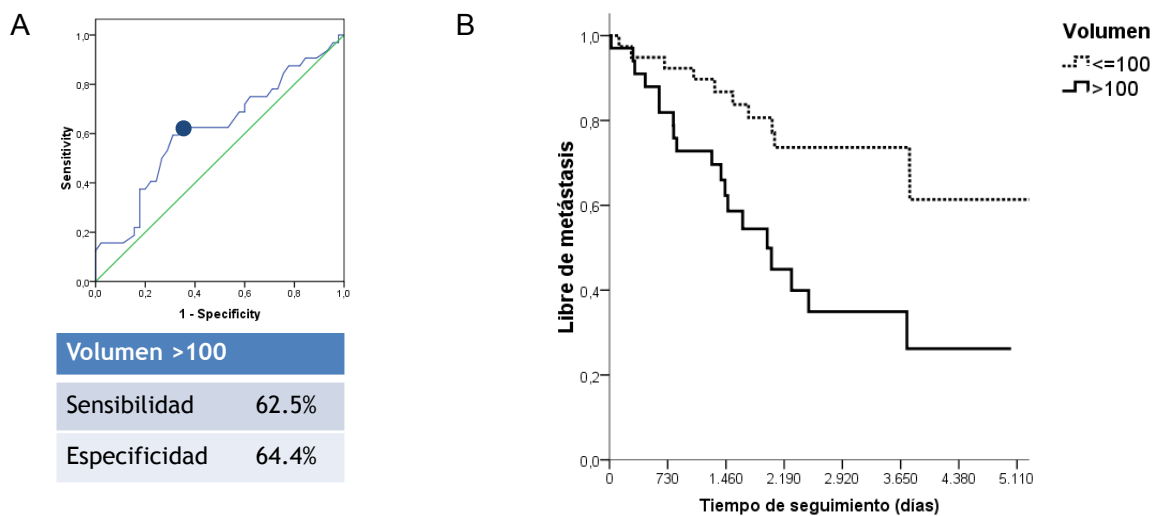


Figura 46. A: curva ROC para punto de corte. B: riesgo de metástasis según el volumen tumoral.

Así, el tiempo medio estimado libre de metástasis es de 4579 días (ic 95%: 3812-5344) en aquellos con volumen ≤ 100 , muy superior a los que tienen un volumen >100 con un tiempo medio libre de metástasis de 2487 días (ic 95%: 1087-3168). La supervivencia estimada libre de metástasis a los 10 años en volúmenes ≤ 100 es del 73,6%, mucho más alta que la de los pacientes con volumen >100 , que es del 34,9%.

Localización: se comparan los tumores localizados en la coroides frente a los del cuerpo ciliar ya que los otros dos grupos no son comparables individualmente. Se muestra en la figura 47.

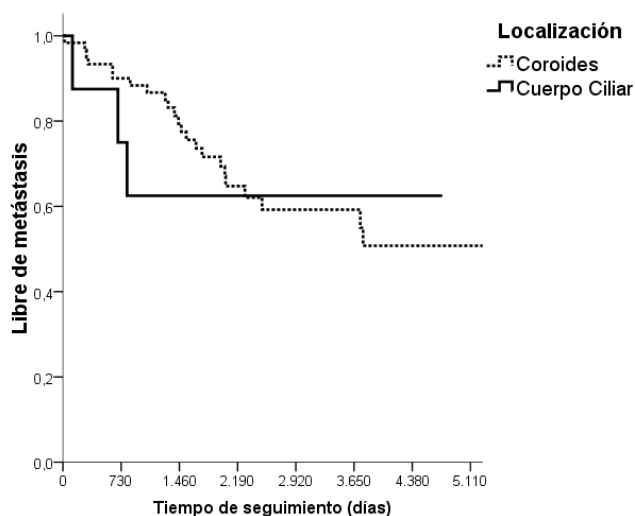


Figura 47. Riesgo de metástasis según la localización. Coroides frente a cuerpo ciliar.

El tiempo estimado libre de metástasis es de 4005 días (ic 95%: 3339-4670) en aquellos con localización en la Coroides, superior a los que están localizados en el Cuerpo ciliar con un tiempo medio libre de metástasis de 3173 días (ic 95%: 1752-4594), aunque estas diferencias no son significativas ($p=0,363$).

Si comparamos los tumores que están localizados en la Coroides frente al resto de pacientes, sí encontramos diferencias significativas ($p=0,042$), observándose que en los tumores que no están localizados en la coroides tienen un mayor riesgo de aparición de metástasis. Lo podemos observar en la figura 48.

Así, el tiempo medio estimado libre de metástasis es de 4005 días (ic 95%: 3339-4670) en aquellos con localización en la Coroides, muy superior a los que no están localizado en la Coroides con un tiempo medio libre de metástasis de 2296 días (ic 95%: 1189-3403). La supervivencia estimada libre de metástasis a los 10 años en los que están localizados en la Coroides es del 59,2%, más alta que la de los pacientes con diferente localización, con un 38,9%.

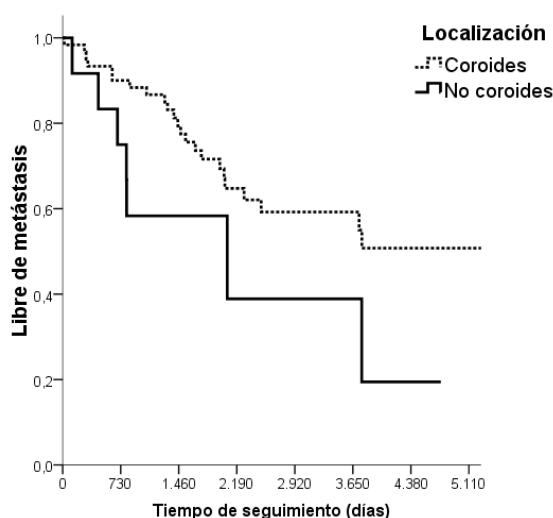


Figura 48. Riesgo de metástasis según la localización. Coroides frente a no coroides.

Estadíaaje: en cuanto a la supervivencia libre de metástasis según el estadíaaje de los pacientes al diagnóstico se observa que, a peor estadíaaje inicial existe un mayor riesgo de metástasis, pero hay demasiados grupos a analizar, algunos con muy pocos casos. Por este motivo es mejor agruparlos en estadios I, II, III. (Ver figura 49).

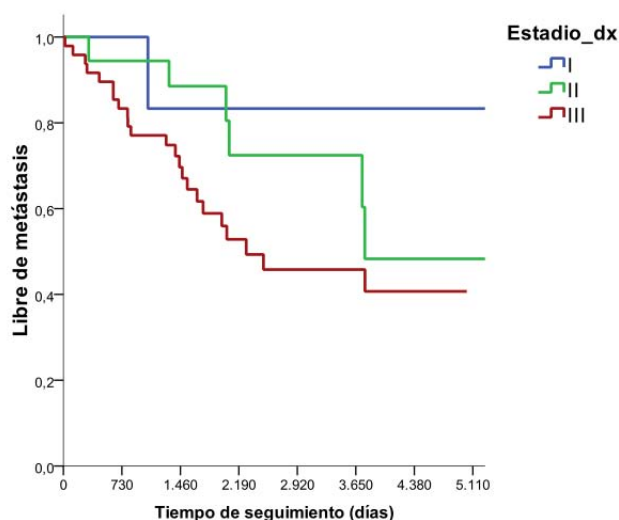


Figura 49. Supervivencia libre de metástasis según el estadiaje al diagnóstico agrupado.

El tiempo medio estimado libre de metástasis en los pacientes con estadio III es de 2922 días (ic 95%: 2325-3518), menor que los de estadio II con 3938 días (ic 95%: 3041-4834) y los de estadio I con 5306 días (IC 95%: 3784-6827).

La supervivencia estimada libre de metástasis a los 10 años en los pacientes en estadio III es del 45,8%, mientras que en los de estadio II es del 72,4% y del 83,3% en los de estadio I.

De todas maneras, aunque sí hay una tendencia que a mayor estadiaje hay mayor riesgo de metástasis, las diferencias no llegan a alcanzar significación estadística ($p=0,070$).

Mitosis (mitosis/10 CGA): los pacientes con valores altos de mitosis se asocian a un mayor riesgo de metástasis ($p=0,001$). El mejor punto de corte que nos optimiza la asociación con metástasis es el de mitosis >2 , (ver figura 50).

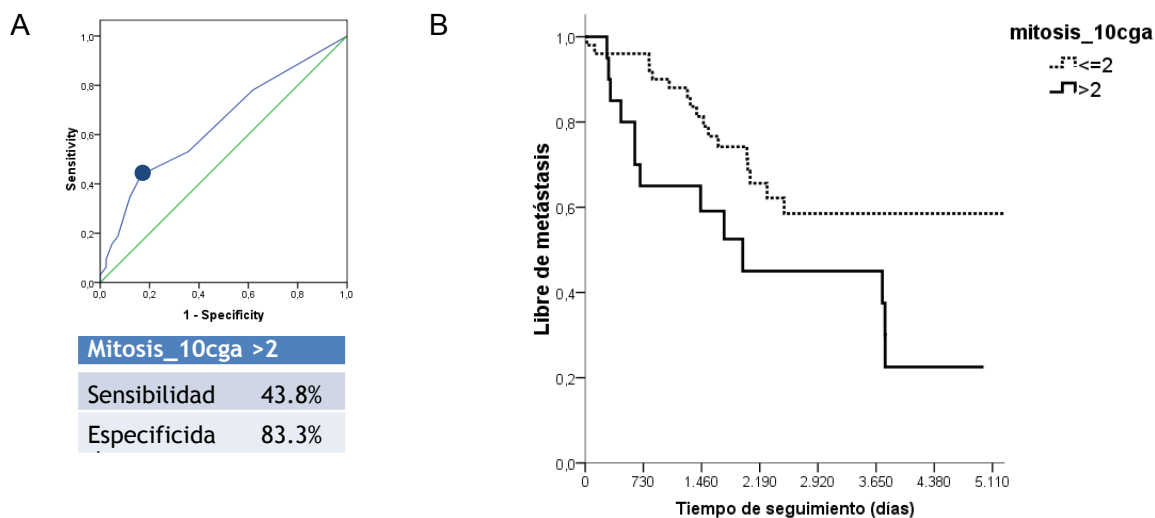


Figura 50. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: supervivencia libre de metástasis según mitosis

El tiempo medio estimado libre de metástasis es de 4221 días (ic 95%: 3493-4949) en aquellos pacientes con mitosis ≤ 2 , muy superior a los que sus valores están por encima de 2, con un tiempo medio libre de metástasis de 2481 días (ic 95%: 1631-3330). La supervivencia estimada libre de metástasis a los 10 años en los que tienen mitosis ≤ 2 es del 58,5%, más alta que la de los pacientes con valores superiores a 2, con un 45%.

Infiltrado (infiltrado inflamatorio linfocitario): los pacientes con infiltrado “intenso” tienen un mayor riesgo de metástasis ($p=0,005$). (Ver figura 51).

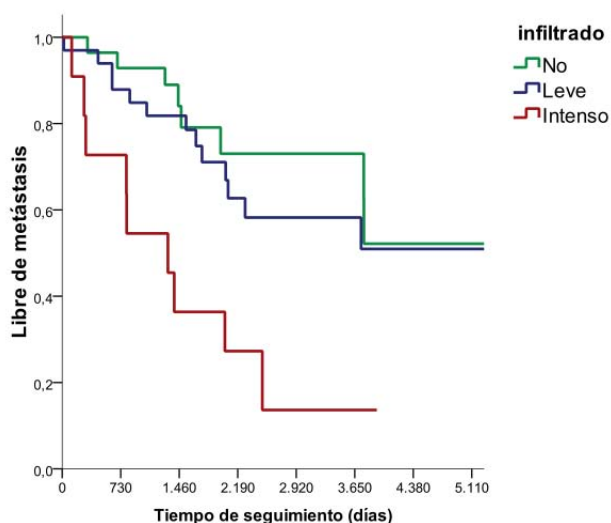


Figura 51. Supervivencia libre de metástasis asociado al infiltrado inflamatorio linfocitario.

El tiempo medio estimado libre de metástasis en los “no infiltrados” es de 3952 días (ic 95%: 3160-4745), en los que tienen infiltrado leve es de 3969 días (ic 95%: 3074-4864), y los de infiltrado intenso 1515 días (IC 95%: 775-2254). La supervivencia estimada libre de metástasis a los 10 años en los “no infiltrados” es del 73%, el 58,2% en los de infiltrado mínimo y el 13,6% en los de infiltrado intenso.

Histología: aunque se observa que los pacientes con histología fusiforme tienen un mejor pronóstico, no hay diferencias significativas entre los grupos ($p=0,205$). El tiempo medio estimado libre de metástasis de los pacientes con histología fusiforme es de 4820 días (ic 95%: 3676-5965), de 3133 (2293-3973) en los de histología mixta y 3051 (2283-3818) en los de histología epitelioide, (ver figura 52).

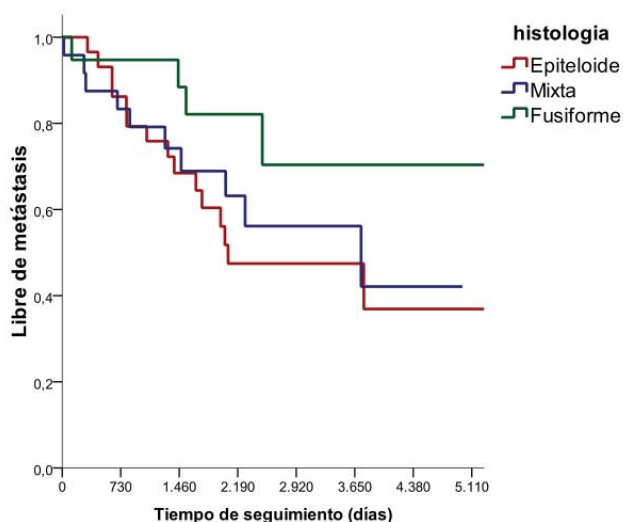


Figura 52. Riesgo de metástasis según la histología.

Tampoco se asociaron de forma significativa con un mayor riesgo de metástasis, la neovascularización ($p=0,114$), la invasión del nervio óptico ($p=0,586$), el estado de la retina ($p=0,168$), la necrosis ($p=0,283$), ni la pigmentación ($p=0,243$).

Análisis multivariante: mediante regresión múltiple de Cox han resultado como predictoras independientes de aparición de metástasis durante el seguimiento las siguientes variables: la edad, el estadiaje en el diagnóstico, la mitosis/10 CGA y el infiltrado inflamatorio. Los resultados del multivariante son los que se detallan en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados del análisis multivariante mediante regresión múltiple de Cox

Variables in the Equation				
	p	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
Edad > 48	,001	13,045	2,857	59,564
Estadio III al diagnóstico	,024	2,841	1,145	7,045
Mitosis/10 CGA >2	,001	4,327	1,880	9,958
Infiltrado inflamatorio intenso	,000	6,334	2,570	15,606

3.2.2. Comparación variables “signaling”

Sólo hay diferencias estadísticamente significativas en el marcador HER3.

HER3: los pacientes con expresión de HER3 baja tienen un mayor riesgo de hacer metástasis durante el seguimiento (p=0,035) (ver figura 53).

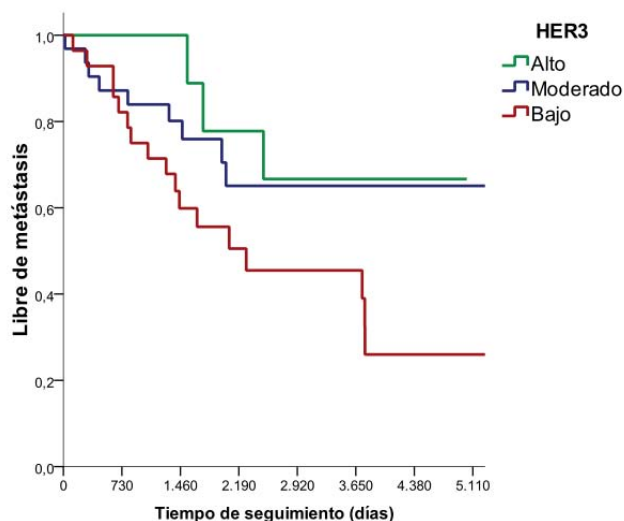


Figura 53. Supervivencia libre de metástasis asociado a HER3.

La supervivencia libre de metástasis, por ejemplo a los 12 años, en los pacientes con un HER3 bajo es de sólo el 26%, mientras que en aquellos con un HER3 moderado y alto es del 65,1% y 66,7% respectivamente.

Además el tiempo medio estimado libre de metástasis es de 2766 días (ic 95%: 2006-3525) en los pacientes con HER3 bajo, mientras que en los de moderado y alto

este tiempo medio es muy superior, 4396 (ic 95%: 3442-5351) y 3999 (ic 95%: 3030-4968) respectivamente.

Ki67: aunque hay cierta tendencia a que los pacientes con un Ki67 más alto tengan un mayor riesgo de metástasis, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0,107$). En la figura 54 se muestra una comparación con el punto de corte que mejor discrimina el riesgo de metástasis.

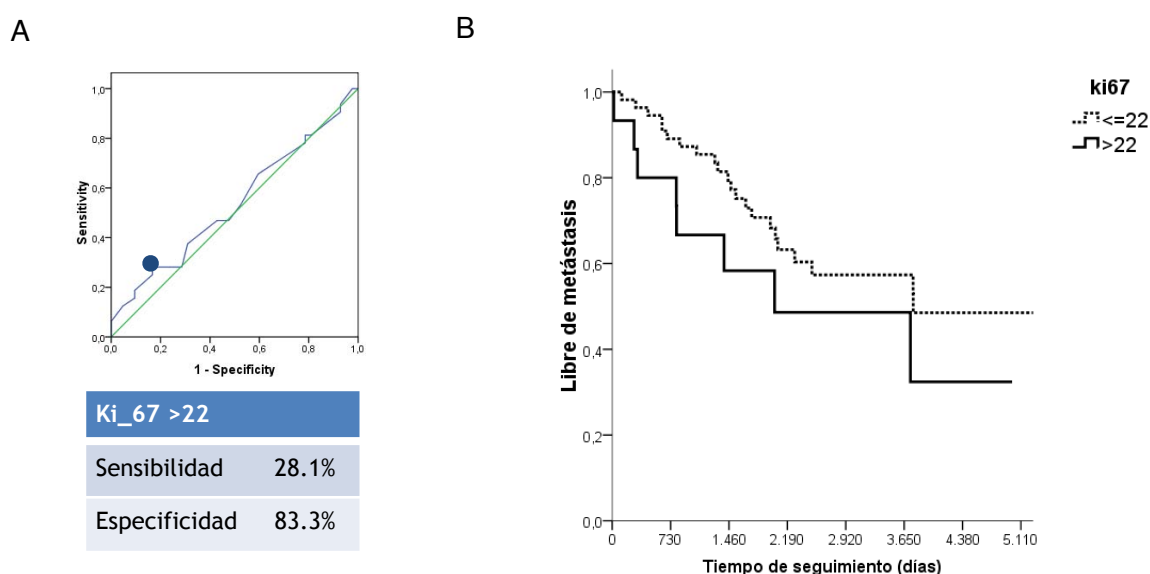


Figura 54. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de metástasis según Ki67.

Por lo que respecta al resto de marcadores realizados en la serie no se ha hallado ninguna diferencia en la comparación de curvas.

Por tanto el único marcador que nos predice un mayor riesgo de metástasis es el HER3 bajo, con una HR: 2,273 (ic 95%: 1,085-4,765), $p=0,030$. Así, los pacientes con HER3 bajo tienen más del doble de riesgo de hacer metástasis durante el seguimiento que los que tienen HER3 moderado-grave.

3.2.3. Análisis Multivariante. Variables “signaling” + variables clínicas

Si hacemos un análisis multivariante incluyendo HER3 y las variables clínicas que son estadísticamente significativas, nos salen como predictoras independientes de aparición de metástasis HER3 bajo junto con la edad, el estadiaje en el diagnóstico,

la mitosis/10 CGA y el infiltrado intenso. Los resultados del multivariante se detallan en la tabla 16.

Tras ajustar por las variables clínicas que influyen en la aparición de metástasis, observamos que los pacientes con HER3 bajo siguen teniendo más del doble de riesgo de hacer metástasis durante el seguimiento que el resto de pacientes.

Tabla 16. Resultados del análisis multivariante de los marcadores “signaling” con la clínica.

	Variables in the Equation			
	p	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
HER3 bajo	,015	2,662	1,214	5,836
Edad > 48	,000	17,458	3,516	86,674
Mitosis/10 CGA >2	,002	3,967	1,679	9,373
Infiltrado inflamatorio intenso	,000	6,822	2,673	17,410
Estadio III al diagnóstico	,021	3,122	1,191	8,183

3.3 Análisis del periodo libre de éxitus por enfermedad

De los 74 pacientes en los que disponemos datos de seguimiento, hay un total de 23 pacientes que han resultado éxitus por la enfermedad.

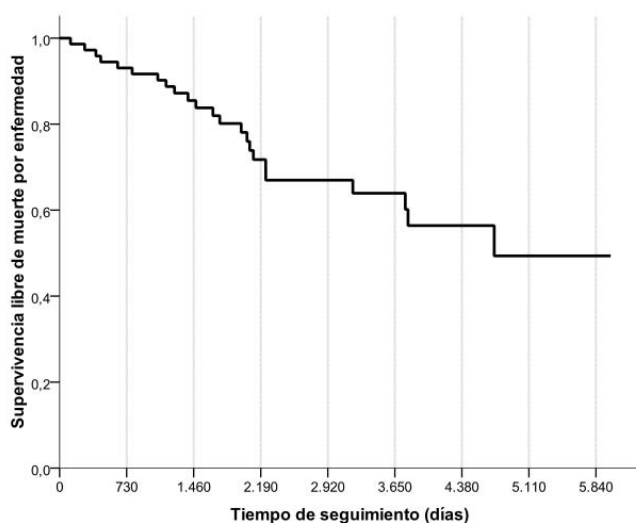


Figura 55. Curva de supervivencia libre de éxitus por enfermedad.

El tiempo medio estimado de supervivencia libre de éxitus por enfermedad es de 4232 días (ic 95%: 3625-4840), con supervivencias estimadas a diferentes años de: 1º año: 97,2% (e.e. 1,4%), 2º año: 93,1% (3%), 3º año: 88,7% (3,8%), 5º año: 80,1% (5%), 10º año: 63,9% (6,9%), 15º año: 49,4% (9,5%). (Ver figura 55).

3.3.1. Comparación de variables clínicas

Sexo: no influye en la supervivencia ($p=0,549$)

Edad: tomándola como variable numérica no influye en la supervivencia. Con el punto de corte mayor a 48 años vemos que el riesgo de éxitus por enfermedad es superior al resto de pacientes ($p=0,020$) (ver figura 56).

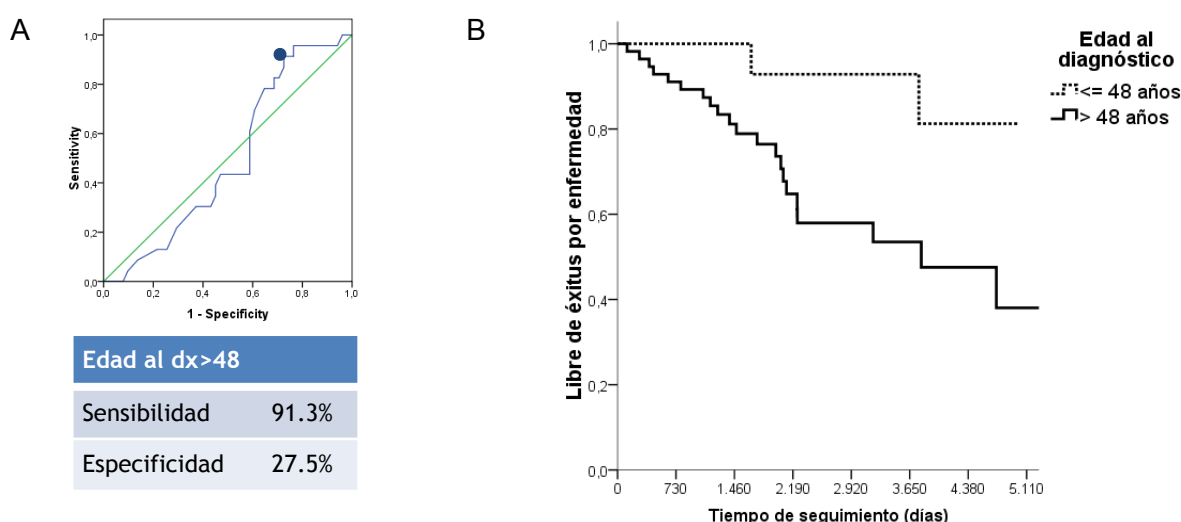


Figura 56. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de éxitus por enfermedad según la edad.

Así, el tiempo medio estimado libre de éxitus por enfermedad es de 4617 días (ic 95%: 4114-5119) en aquellos con edades ≤ 48 años, muy superior a los que son mayores de 48 años con un tiempo medio de supervivencia de 3775 días (ic 95%: 3049-4501). La supervivencia estimada a los 10 años en edades ≤ 48 años es del 92,9%, mucho más alta que la de los pacientes mayores de 48 años, que es del 53,5%.

Volumen: se asocia de forma estadísticamente significativa a un mayor riesgo de éxitus por enfermedad ($p=0,002$). Se ha hallado un punto de corte óptimo (volumen ≥ 150) a partir del cual hay un mayor riesgo de éxitus por enfermedad (ver figura 57).

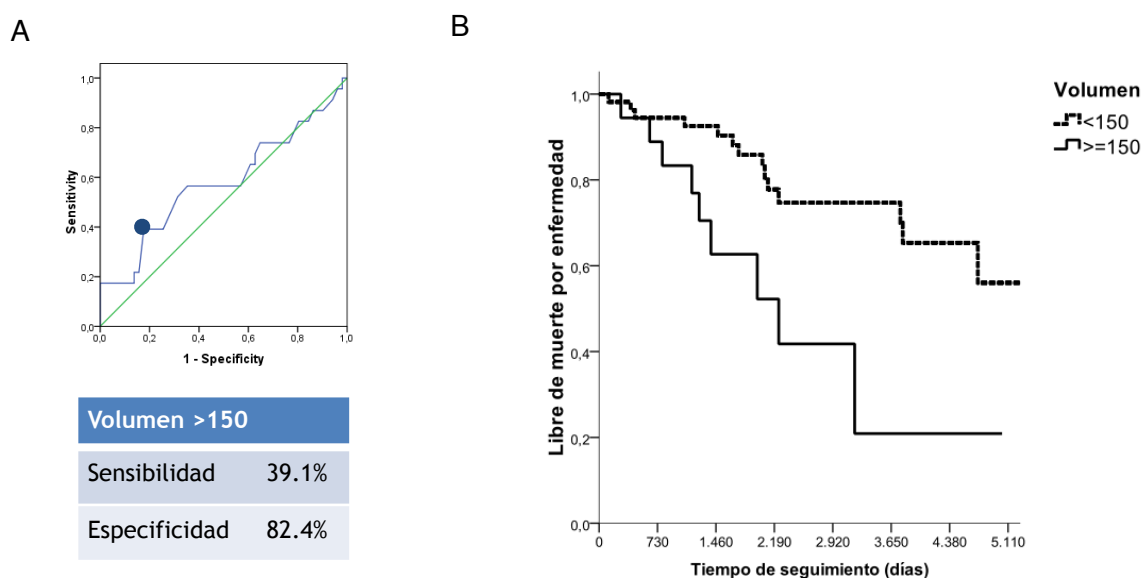


Figura 57. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de muerte por enfermedad según volumen.

El tiempo medio estimado de supervivencia libre de éxitus por enfermedad es de 4626 días (ic 95%: 3973-5280) en aquellos con volumen <150 , muy superior a los que tienen un volumen ≥ 150 con un tiempo medio libre de supervivencia de 2517 días (ic 95%: 1584-3451). La supervivencia estimada a los 10 años en volúmenes <150 es del 74,7%, mucho más alta que la de los pacientes con volumen ≥ 150 que es del 20,9%.

Localización: si se comparan los tumores localizados en la coroides frente a los del cuerpo ciliar, el tiempo estimado libre de muerte por enfermedad es de 4481 días (ic 95%: 3841-5121) en aquellos con localización en la Coroides, superior a los que están localizados en el Cuerpo ciliar con un tiempo medio libre de muerte por enfermedad de 3409 días (ic 95%: 1848-4970), aunque estas diferencias no son significativas ($p=0,460$).

Si comparamos los tumores localizados en la Coroides frente al resto de pacientes, sí encontramos diferencias significativas ($p=0,016$) observándose que los tumores que no están localizados en la coroides tienen un mayor riesgo de muerte por enfermedad (ver figura 58).

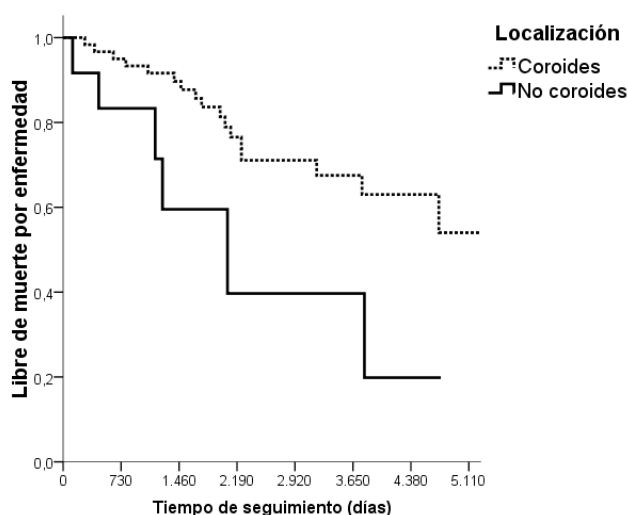


Figura 58. Riesgo de muerte por enfermedad según localización.

Así, el tiempo medio de supervivencia es de 4480,8 días (ic 95%: 3841-5121) en aquellos con localización en la Coroides, muy superior a los que no están localizados en la Coroides, con un tiempo medio de supervivencia de 2440 días (ic 95%: 1307-3573). La supervivencia estimada a los 10 años en los que están localizados en la Coroides es del 67,5%, más alta que la de los pacientes con diferente localización, con un 39,7%.

Estadaje: aunque sí se observa que a un peor estadaje inicial existe un mayor riesgo de muerte por enfermedad, hay demasiados grupos a analizar, algunos con muy pocos casos. Al agruparlos en estadio I, II, III, vemos que el tiempo medio estimado libre de muerte por enfermedad en los pacientes con estadio III es de 3506 días (ic 95%: 2927-4085), menor que los de estadio II con 4085 días (ic 95%: 3238-4932) y los de estadio I con 5308 días (IC 95%: 3791-6825), (ver figura 59).

La supervivencia estimada a los 10 años en los pacientes en estadio III es del 57,3%, mientras que en los de estadio II es del 72,4% y del 83,3% en los de estadio I.

De todas maneras aunque se observa cierta tendencia a que a mayor estadiaje hay mayor riesgo de muerte por enfermedad, no obtenemos ninguna significación estadística ($p=0,322$).

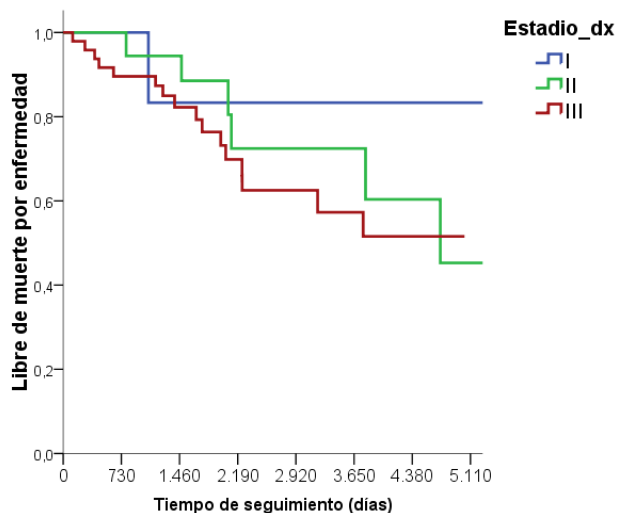


Figura 59. Supervivencia libre de enfermedad según estadio al diagnóstico.

Histología: los pacientes con histología epitelioide tienen un mayor riesgo de muerte por enfermedad que los de histología mixta y fusiforme ($p=0,033$). Lo podemos observar mejor en la figura 60.

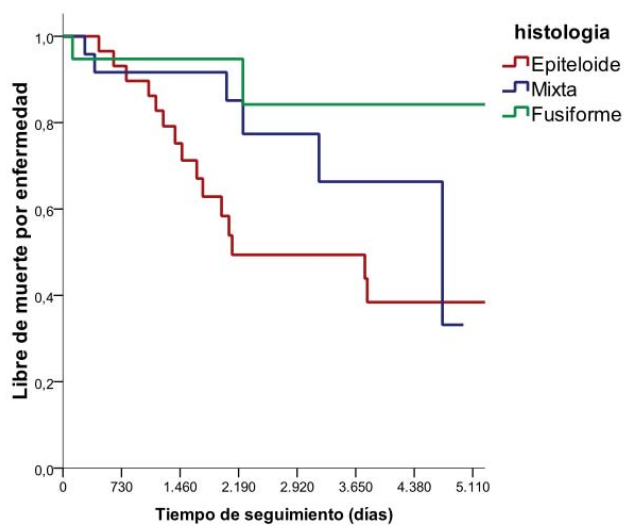


Figura 60. Riesgo de muerte por enfermedad según la histología del MU.

El tiempo medio de supervivencia libre de muerte por enfermedad es de 5426 días (ic 95%: 4480-6372) en aquellos de histología fusiforme, superior a los de histología mixta, con un tiempo medio de supervivencia de 3912 días (ic 95%: 3193-4631), que a su vez es superior a la histología epitelioides con un tiempo de supervivencia de 3209 (ic 95%: 2458-3960). La supervivencia libre de muerte por enfermedad a los 10 años en la etiología fusiforme es del 84,2%, más alta que el 66,3% de la histología mixta y el 49,4% de la histología epitelioides.

Mitosis: los pacientes con valores altos de mitosis/10 CGA se asocian con un mayor riesgo de muerte por enfermedad ($p=0,002$). El mejor punto de corte que nos optimiza la asociación con un mayor riesgo de muerte es el de mitosis/10 CGA >4 . En la figura 61 se muestra dicha asociación.

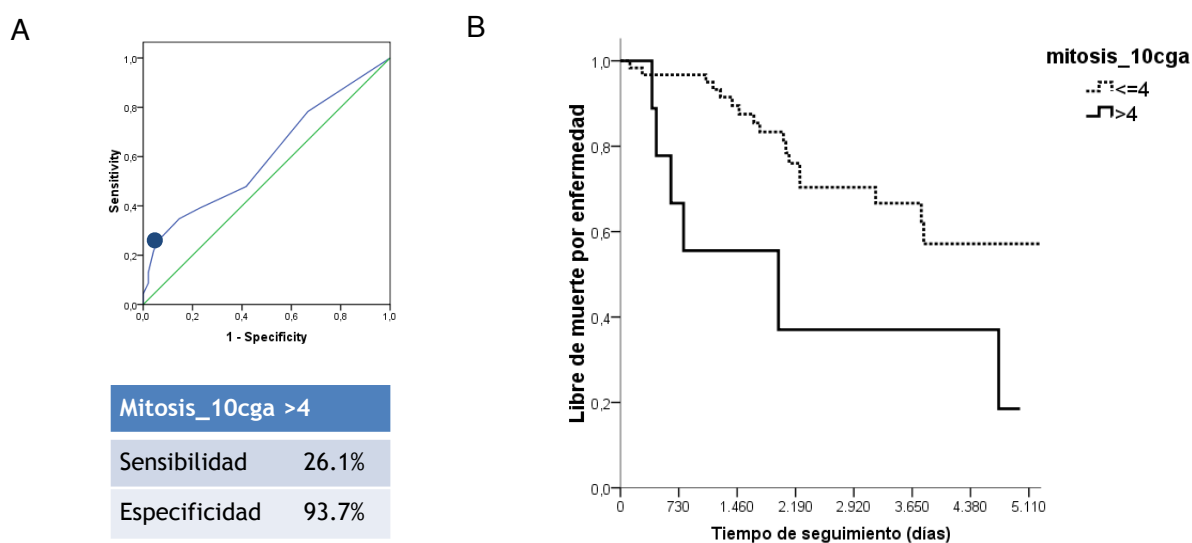


Figura 61. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de muerte por enfermedad según mitosis.

El tiempo medio de supervivencia es de 4470 días (ic 95%: 3827-5112) en aquellos con mitosis/10 CGA ≤ 4 , muy superior a los que sus valores están por encima de 4, con un tiempo medio de supervivencia de 2419 días (ic 95%: 1035-3803). La supervivencia estimada a los 10 años en los que tienen mitosis/10 CGA ≤ 4 es del 66,7%, más alta que la de los pacientes con valores superiores a 4, con un 37%.

Infiltrado (infiltrado inflamatorio linfocitario): Los pacientes con infiltrado inflamatorio intenso tienen un mayor riesgo de muerte por enfermedad ($p=0,015$) (ver figura 62).

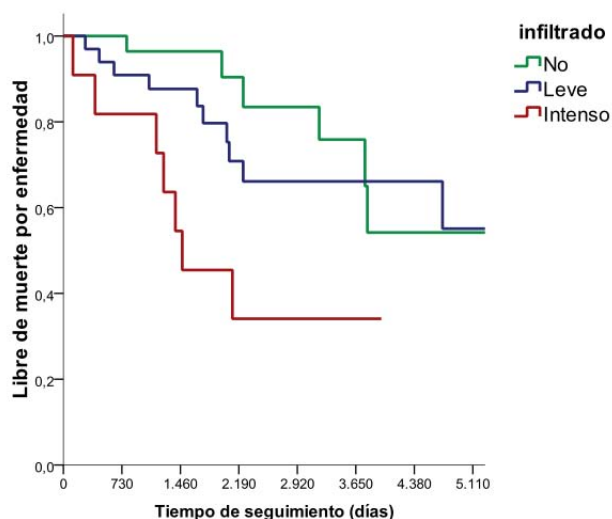


Figura 62. Riesgo de muerte por enfermedad según infiltrado.

El tiempo medio de supervivencia en los que no poseen infiltrado inflamatorio es de 4291 días (ic 95%: 3589-4993), en los que se observa infiltrado mínimo es de 4412 días (ic 95%: 3549-5276), y en los que hay presencia de infiltrado intenso 2119 días (ic 95%: 1261-2978). La supervivencia estimada a los 10 años en los que no poseen infiltrado inflamatorio es del 75,9%, el 66,1% en los de infiltrado mínimo y el 34,1% en los de infiltrado intenso.

Ni la neovascularización ($p=0,102$), ni la invasión del nervio óptico ($p=0,724$), ni el estado de la retina ($p=0,799$), ni la necrosis ($p=0,247$), ni la pigmentación ($p=0,536$) se asociaron con un mayor riesgo de muerte por enfermedad.

Análisis multivariante: en un análisis multivariante han resultado como variables predictoras independientes de éxito por enfermedad la edad, la mitosis/10 CGA, el infiltrado inflamatorio y la histología. Los resultados del análisis multivariante están los representados en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados del análisis multivariante con variables clínicas.

	Variables in the Equation			
	p	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
Edad > 48	,010	7,312	1,618	33,040
Histología epiteloide	,021	2,857	1,173	6,960
Mitosis/10 CGA >4	,003	4,883	1,737	13,729
Infiltrado inflamatorio intenso	,004	4,267	1,591	11,444

3.3.2. Comparación de variables “signaling”

Ki67: los valores altos de Ki67 se asocian de forma significativa a una mayor mortalidad por enfermedad ($p=0,012$). Un buen punto de corte es $Ki67 >22$, el cual nos da una supervivencia media de 2965 días (ic 95%: 1923-4008), bastante más baja que los que tienen un $Ki67 \leq 22$ con una supervivencia de 4530 (ic 95%: 1923-4008) (ver figura 63).

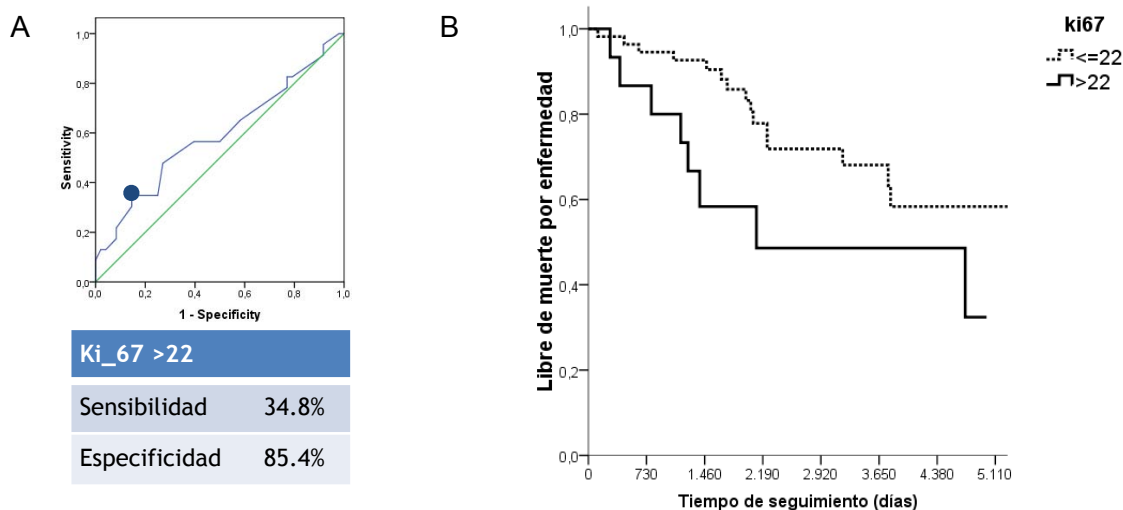


Figura 63. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de muerte por enfermedad según Ki67.

La supervivencia libre de éxito por enfermedad, por ejemplo a los 10 años, en los pacientes con un $Ki67 >22$ es de sólo el 48,6%, mientras que en aquellos con un $Ki67 \leq 22$ es del 68,1%.

P16: observamos una mayor mortalidad por enfermedad en aquellos pacientes con una expresión de P16 moderada o baja ($p=0,032$). Lo podemos observar mejor en las figuras 64 y 65.

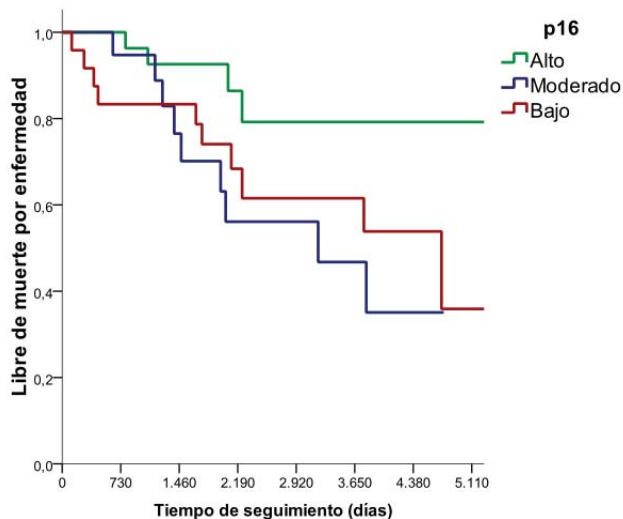


Figura 64. Riesgo de muerte por enfermedad según P16 (3 categorías: alto, moderado, bajo).

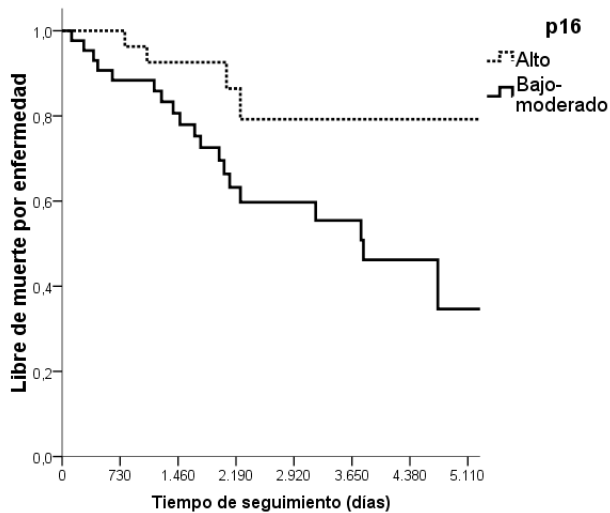


Figura 65. Riesgo de muerte por enfermedad según P16 (2 categorías: alto, bajo-moderado).

La supervivencia media de los pacientes con expresión de P16 alta fue mucho más larga que el resto de pacientes: 5235 días (IC 95%: 4408-6062) frente a 3446 días (ic 95%: 3607-4828).

En la comparación de curvas con el resto de marcadores del signaling no se ha encontrado ninguna diferencia significativa en ninguno de ellos.

Por tanto los marcadores que se asocian a una mayor mortalidad por enfermedad son Ki67 y P16. Tras realizarse un análisis multivariante sólo con los marcadores observamos los resultados en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados del análisis multivariante de las variables de signaling.

	Variables in the Equation			
	p	H.R.	95,0% CI for H.R.	
			Lower	Upper
P16 bajo-moderado	,041	3,081	1,047	9,068
Ki67 >22	,046	2,421	1,015	5,775

Así, P16 bajo-moderado y Ki67 >22 predicen de forma independiente la mortalidad por enfermedad durante el seguimiento.

El riesgo de muerte por enfermedad a lo largo del seguimiento es 2,4 veces superior en los pacientes con Ki67 >22 con respecto a aquellos con un Ki67 <22. En los pacientes con un P16 bajo-moderado este riesgo es 3,1 veces superior a los pacientes con un P16 bajo. Combinando los 2 marcadores, el riesgo de muerte por enfermedad se incrementa, siendo 3,6 veces superior cuando ambos son positivos con respecto al resto de pacientes. (HR: 3,593; IC95%: 1,465-8,810). En la figura 66 se observa como la combinación de ambos incrementa el riesgo de éxitus de forma considerable.

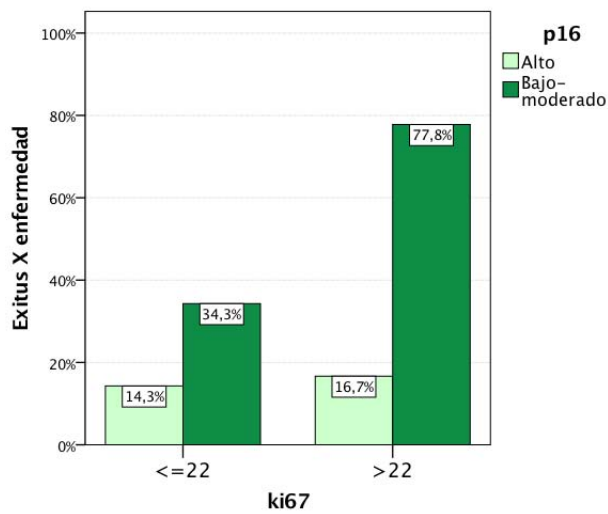


Figura 66. Incremento de riesgo de éxitus cuando se combinan Ki67 y P16.

A continuación, observamos como la supervivencia libre de enfermedad es muy inferior en aquellos pacientes en los que la combinación de los 2 marcadores es positiva, siendo sólo del 33,3% a los 10 años de seguimiento, respecto al 63,8% cuando sólo hay uno positivo y al 79,1% cuando ambos son negativos.

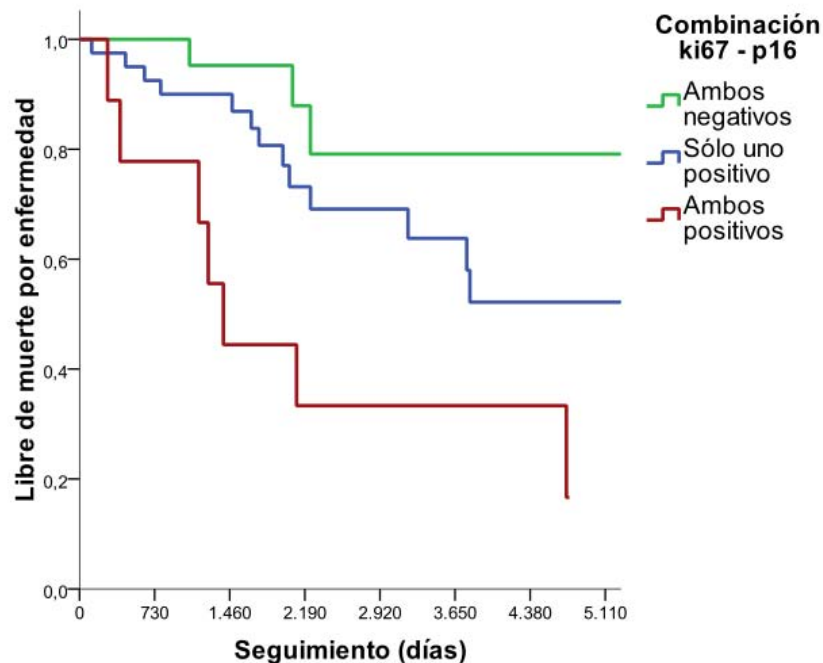


Figura 67. Kaplan Meyer de la supervivencia libre de muerte por enfermedad según la combinación de Ki67 y P16.

El tiempo medio libre de muerte por enfermedad cuando ambos marcadores son normales es de 5235 días (ic95%: 4408-6062). En cambio, cuando ambos marcadores son positivos este tiempo es muy inferior, de 2313 días (ic95%: 1141-3484).

Tabla 19. Valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de P16 bajo-moderado, Ki67 >22 y su combinación

	P16 bajo-moderado (A)	Ki67 >22 núcleos/CGA (B)	Combinación A + B
VPP	43,2%	53,3%	77,8%
VPN	85,2%	73,2%	74,2%

3.3.3. Multivariante variables “signaling” + variables clínicas

Si hacemos un análisis multivariante incluyendo Ki67, P16 y las variables clínicas significativas resultan como predictoras independientes de éxito por enfermedad la edad, las mitosis/10 CGA, el infiltrado inflamatorio intenso y la histología epiteloide. Los resultados del análisis multivariante son los que se detallan en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados del análisis multivariante con variables de signaling y las clínicas.

	Variables in the Equation			
	p	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
Edad > 48	,010	7,312	1,618	33,040
Histología epiteloide	,021	2,857	1,173	6,960
Mitosis/10 CGA >4	,003	4,883	1,737	13,729
Infiltrado inflamatorio intenso	,004	4,267	1,591	11,444

3.4. Análisis de supervivencia global

De los 74 pacientes en los que disponemos de datos de seguimiento hay un total de 32 pacientes que han fallecido por cualquier causa durante el seguimiento, (ver figura 68).

El tiempo medio estimado de supervivencia es de 3646 días (ic 95%: 3053-4240), con supervivencias estimadas a diferentes años de: 1º año: 97,2% (e.e. 1,9%), 2º año: 93,1% (3%), 3º año: 87,4% (3,9%), 5º año: 70,1% (5,6%), 10º año: 54,1% (6,73%), 15º año: 27,9% (12,7%).

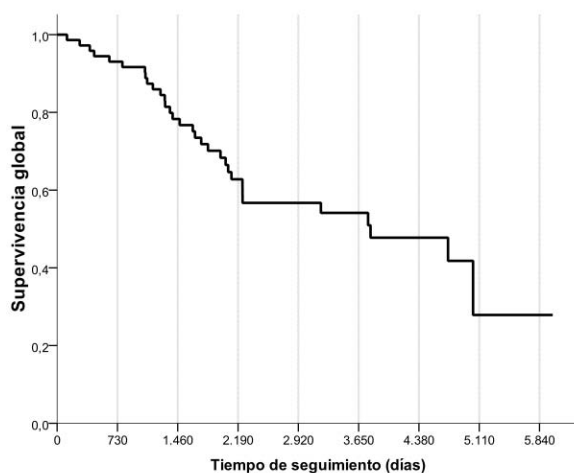


Figura 68. Supervivencia global.

3.4.1. Comparación variables clínicas.

Sexo: no influye en la supervivencia global ($p=0,871$).

Edad: la edad sí que se asocia a la supervivencia global ($p=0,005$). En la figura 69 se muestra el gráfico de supervivencia dividiendo la edad entre dos grupos cogiendo como punto de corte una edad mayor de 48 años a partir de la cual el riesgo de éxitus por enfermedad es muy superior al resto de pacientes ($p=0,004$).

El tiempo medio estimado libre de éxitus por enfermedad es de 4617 días (ic 95%: 4114-5119) en aquellos con edades ≤ 48 años, muy superior a los que son mayores de 48 años con un tiempo medio de supervivencia de 3160 días (ic 95%: 2527-3793). La supervivencia estimada a los 10 años en edades ≤ 48 años es del 92,9%, mucho más alta que la de los pacientes mayores de 48 años, que es del 42,2%.

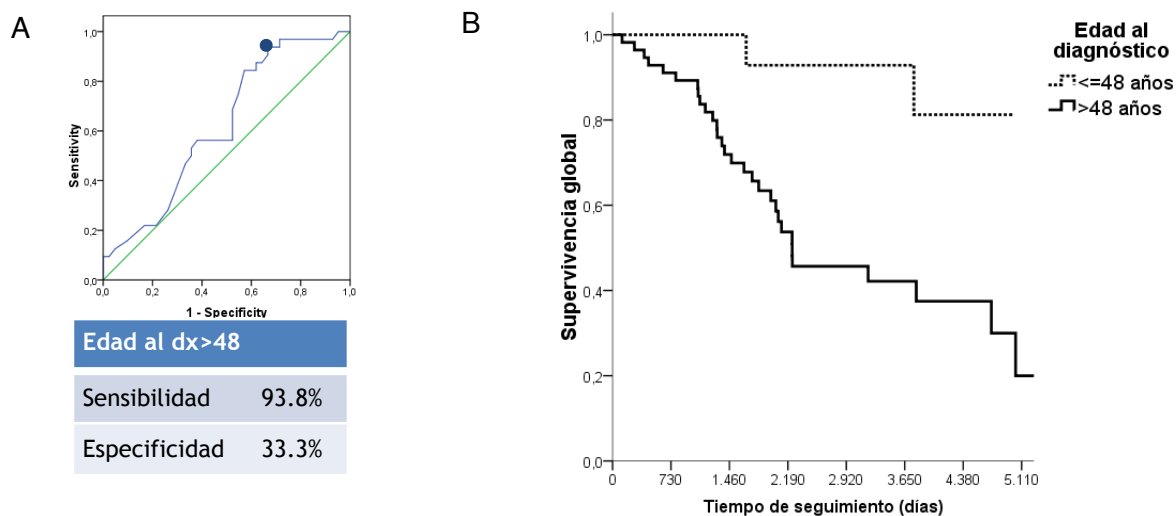


Figura 69. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: supervivencia global según la edad.

Volumen: se asocia de forma estadísticamente significativa a un mayor riesgo de éxitus ($p < 0,001$). Se ha hallado un punto de corte óptimo (volumen ≥ 150) a partir del cual hay un mayor riesgo de éxitus. (Ver figura 70).

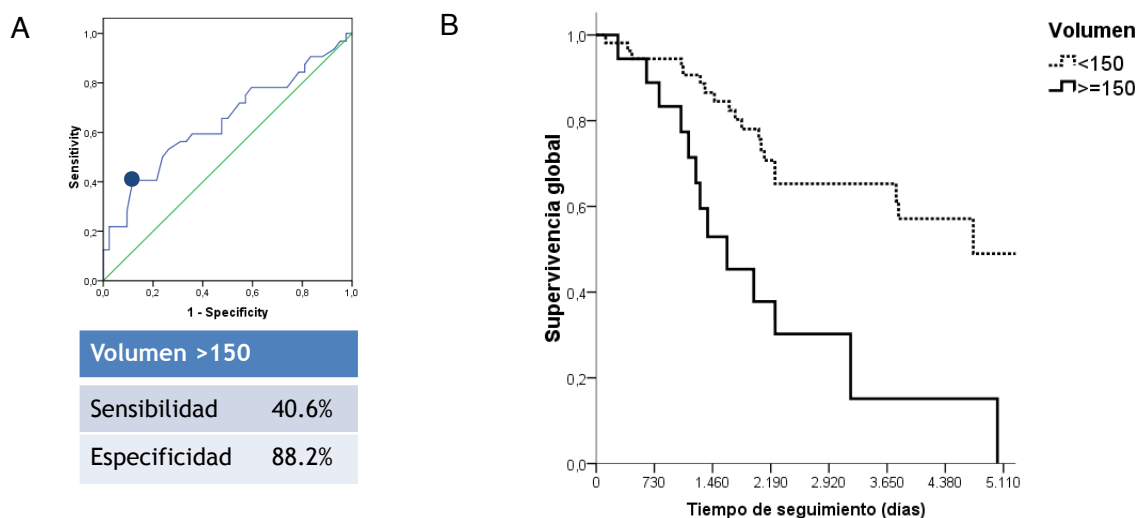


Figura 70. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de éxitus global según el volumen.

El tiempo medio estimado de supervivencia libre de éxitus es de 4240 días (ic 95%: 3580-4900) en aquellos con volumen < 150 , muy superior a los que tienen un volumen ≥ 150 con un tiempo medio libre de supervivencia de 2157 días (ic 95%: 1343-2971). La supervivencia estimada a los 10 años en pacientes con tumores de

volúmenes <150 es del 65,3%, mucho más alta que la de los que presentan volumen ≥ 150 , que es del 15,1%.

Localización: los tumores localizados en el cuerpo ciliar tienen un mayor riesgo de fallecer ($p=0,006$), (ver figura 71).

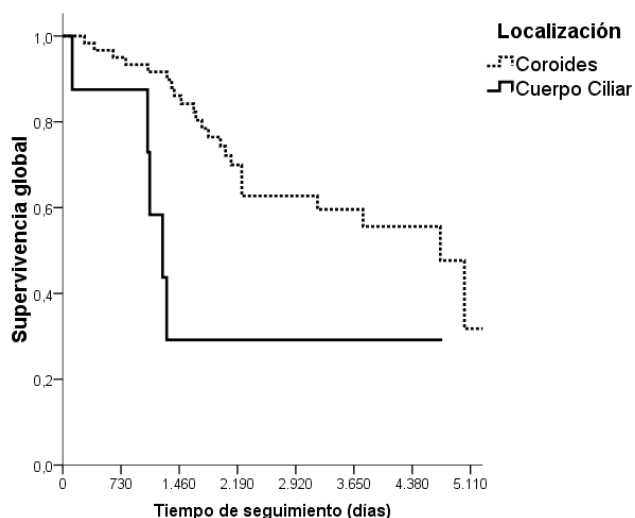


Figura 71. Supervivencia global según localización.

El tiempo medio de supervivencia es de 3966 días (ic 95%: 3325-4608) en aquellos con localización en la coroides, muy superior a los que están localizados en el cuerpo ciliar, con un tiempo medio de supervivencia de 2088 días (ic 95%: 797-3378). La supervivencia estimada a los 10 años en los que están localizados en la coroides es del 59,6%, más alta que la de los pacientes con localización en el cuerpo ciliar, con un 29,2%.

Estadaje: aunque sí se observa que a un peor estadaje inicial existe un mayor riesgo de muerte por enfermedad, hay demasiados grupos a analizar, algunos con muy pocos casos. Al agruparlos en estadio I, II, III, obtenemos el gráfico de la figura 72.

El tiempo medio estimado libre de muerte por enfermedad en los pacientes con estadio III es de 3189 días (ic 95%: 2609-3770), menor que los de estadio II con 3557 días (ic 95%: 2695-4419) y los de estadio I con 5308 días (ic 95%: 3791-6825).

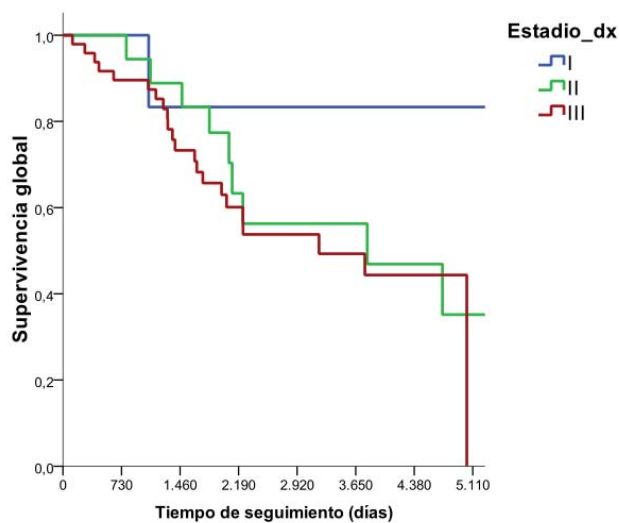


Figura 72. Supervivencia global según estadiaje al diagnóstico.

La supervivencia estimada a los 10 años en los que pacientes con estadio III es del 49,3%, mientras que en los de estadio II es del 56,3% y del 83,3% en los de estadio I.

De todas maneras, aunque se observa cierta tendencia que a peor estadiaje hay mayor riesgo de muerte por enfermedad, no obtenemos ninguna significación estadística ($p=0,192$).

Histología: los pacientes con histología epitelioides tienen un mayor riesgo de muerte que los que presentan histología mixta y fusiforme ($p=0,019$), (ver figura 73).

El tiempo medio de supervivencia es de 5183 días (ic 95%: 4172-6193) en aquellos de histología fusiforme, superior a los de histología mixta con un tiempo medio de supervivencia de 3479 días (ic 95%: 2726-4233), que a su vez es superior a los de histología epitelioides con un tiempo de supervivencia de 2793 días (ic 95%: 2126-3460). La supervivencia a los 10 años en los de histología fusiforme es del 79,5%, más alta que el 54,4% de los de histología mixta y el 39,6% de los de histología epitelioides.

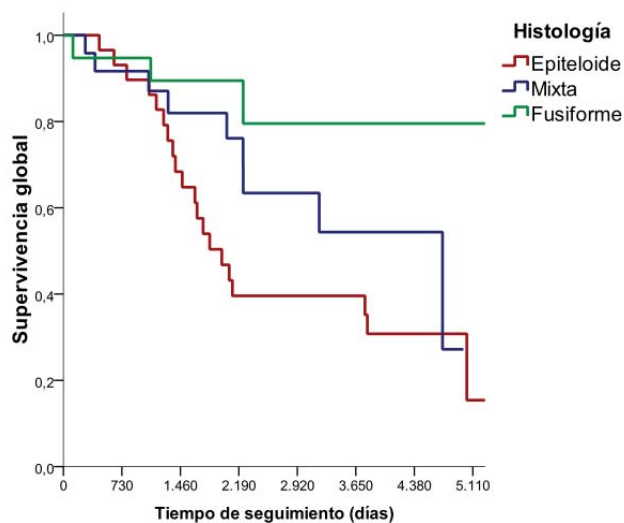


Figura 73. Supervivencia global según la histología del tumor (MU).

Mitosis: los pacientes con valores altos de mitosis/10 CGA se asocian con una mayor mortalidad ($p < 0,001$). El mejor punto de corte que nos optimiza la asociación con un mayor riesgo de muerte es el de mitosis/10 CGA > 4 . En la figura 74 se muestra un gráfico con dicha asociación.

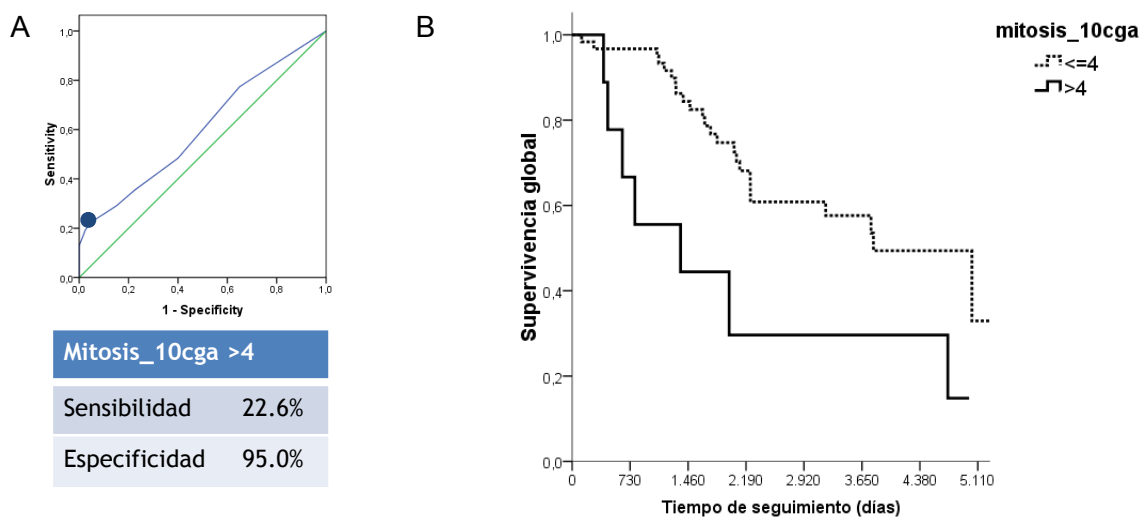


Figura 74. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: riesgo de muerte global según mitosis/10CGA.

El tiempo medio de supervivencia es de 3890 días (ic 95%: 3241-4539) en aquellos pacientes con mitosis/10 CGA ≤ 4 , muy superior a los que sus valores están por encima de 4, con un tiempo medio de supervivencia de 2137 días (ic 95%:

886-3388). La supervivencia estimada a los 10 años en los que tienen mitosis/10 CGA ≤ 4 es del 57,6%, más alta que la de los pacientes con valores superiores a 4, con un 29,6%.

Infiltrado inflamatorio linfocitario: Hay una tendencia a que los pacientes con infiltrado inflamatorio intenso tengan un mayor riesgo de muerte ($p=0,054$), aunque no llega a ser estadísticamente significativo. Lo observamos en la figura 75.

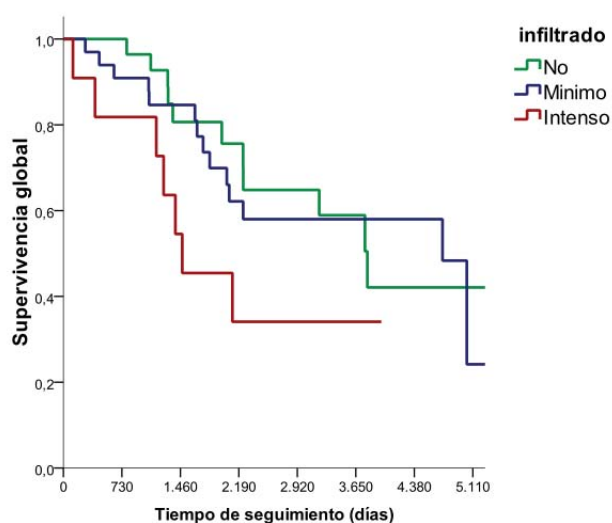


Figura 75. Riesgo de muerte global asociado a la presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario.

Ni la neovascularización ($p=0,098$), ni la invasión del nervio óptico ($p=0,289$), ni el estado de la retina ($p=0,769$), ni la necrosis ($p=0,099$), ni la pigmentación ($p=0,579$) se asociaron de forma significativa a una mayor mortalidad.

Análisis multivariante: en un análisis multivariante incluyendo todas las variables asociadas de forma estadísticamente significativa en el análisis bivariante, han resultado como predictoras independientes de mortalidad, la edad, la mitosis/10cga y la histología. Los resultados se detallan en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados del análisis multivariante.

	Variables in the Equation			
	p	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
Histología epiteloides	,005	2,920	1,384	6,161
Mitosis/10 CGA >4	,016	2,906	1,220	6,924
Edad >48	,006	7,569	1,771	32,344

3.4.2. Comparación de variables de “signaling”

Ki67: los valores altos de Ki67 se asocian de forma significativa a una mayor mortalidad ($p=0,048$). No hay ningún punto de corte que se asocie de forma significativa a una mayor mortalidad. Con un Ki67 >22, la mortalidad es mayor aunque no se llega a alcanzar significación estadística ($p=0,070$). Así, un Ki67 >22 nos da una supervivencia media de 2765 días (ic 95%: 1755-3776), bastante más baja que los que tienen un Ki67 ≤ 22 con una supervivencia de 3967 (IC 95%: 3291-4642) (ver figura 76).

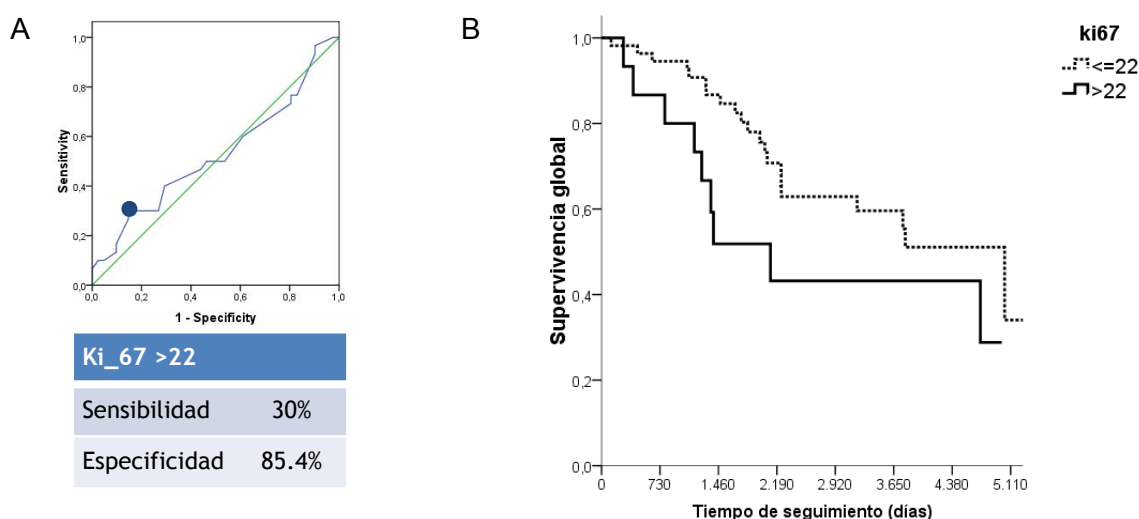


Figura 76. A: curva ROC para punto de corte óptimo. B: supervivencia global según Ki67.

Así la supervivencia a los 10 años en los pacientes con un Ki67 >22 es de sólo el 43,2%, mientras que en aquellos con un Ki67 ≤ 22 es del 59,6%.

P16: observamos una mayor mortalidad en aquellos pacientes con expresión de P16 moderada o baja ($p=0,030$). Lo podemos observar mejor en la figura 77.

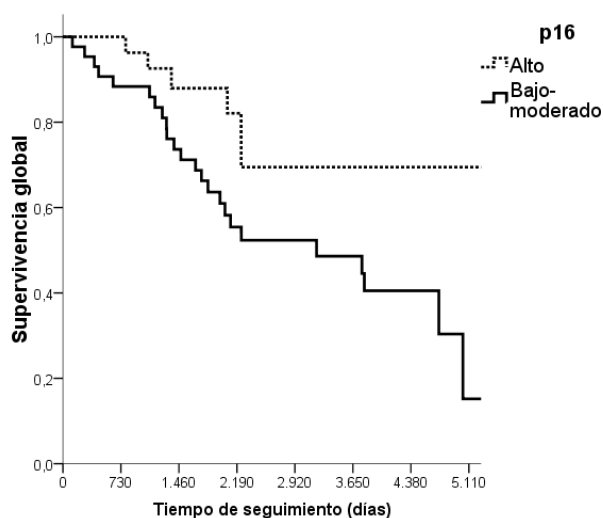


Figura77. Supervivencia global según P16.

La supervivencia media de los pacientes con expresión de P16 alta fue mucho más larga que el resto de pacientes: 4813 días (ic 95%: 3896-5730) en el grupo de P16 alto y 3122 días (ic 95%: 2534-3710) en el de P16 bajo-moderado.

La supervivencia a los 10 años de los pacientes con expresión de P16 alta fue del 69,5%, mientras que en aquellos con expresión de P16 baja-moderada fue del 48,6%.

Las comparaciones de curvas con el resto de marcadores no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Los marcadores que se asocian a una mayor mortalidad son Ki67 y P16 tras realizarse un análisis multivariante sólo con los marcadores (tomando Ki67 como variable numérica). Observamos los resultados en la tabla 22.

Así, el P16 bajo-moderado y el Ki67 son los marcadores que predicen de forma independiente la mortalidad durante el seguimiento.

Tabla 22. Resultados del análisis multivariante.

Variables in the Equation				
	P	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
P16 bajo - moderado	,029	2,720	1,108	6,676
Ki67	,032	1,026	1,002	1,050

3.4.3. Multivariante variables “signaling” + variables clínicas

Si hacemos un análisis multivariante, incluyendo P16 y Ki67 con las variables clínicas que son estadísticamente significativas, nos salen como predictoras independientes de mortalidad, P16, la edad, mitosis/10 CGA y la localización. Los resultados del análisis multivariante se recogen en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados del análisis multivariante con variables clínicas y del signaling.

Variables in the Equation				
	P	HR	95,0% CI for HR	
			Lower	Upper
P16 bajo-moderado	,012	3,205	1,290	7,964
Edad >48	,032	4,996	1,150	21,704
Mitosis/10 CGA >4	,012	3,085	1,287	7,394
Localización en “no coroides”	,013	3,007	1,266	7,141

Tras considerar las variables clínicas que influyen en la aparición de metástasis, observamos que los pacientes con un P16 moderado o bajo triplican el riesgo de muerte durante el seguimiento.

A modo de resumen se presentan en la tabla 24 las variables estadísticamente significativas, que predicen pronóstico, en cada uno de los tres escenarios valorados (riesgo de metástasis, riesgo de muerte por enfermedad y supervivencia global).

Tabla 24. Resumen de las variables predictoras de pronóstico.

Aumento del riesgo de metástasis	Aumento del riesgo de muerte por enfermedad	Disminución de la supervivencia global
HER3 bajo	X	X
X	Ki67 >22	Ki67 >22 (p 0.070)
X	P16 bajo-moderado	P16 bajo-moderado
Edad >48 años	Edad >48 años	Edad >48
Localización en “no coroides”	Localización en “no coroides”	Localización en cuerpo ciliar
Volumen >100	Volumen >150	Volumen >150
Mitosis/10 CGA >2	Mitosis/10 CGA >4	Mitosis/10 CGA >4
Infiltrado inflamatorio intenso	Infiltrado inflamatorio intenso	X
X	Histología epiteliode	Histología epiteliode
Estadio III al diagnóstico	X	X

(X) no se ha observado asociación pronóstica con la variable.

4. Análisis mediante “AutoDiscovery”

AutoDiscovery es un programa informático de análisis exploratorio de datos mediante el cual hemos encontrado diferentes relaciones en varios subgrupos de variables.

A partir del proceso de análisis se genera un “mapa de descubrimientos” en el que se identifican las relaciones más significativas entre los diferentes grupos de variables seleccionadas (ver figura 78).

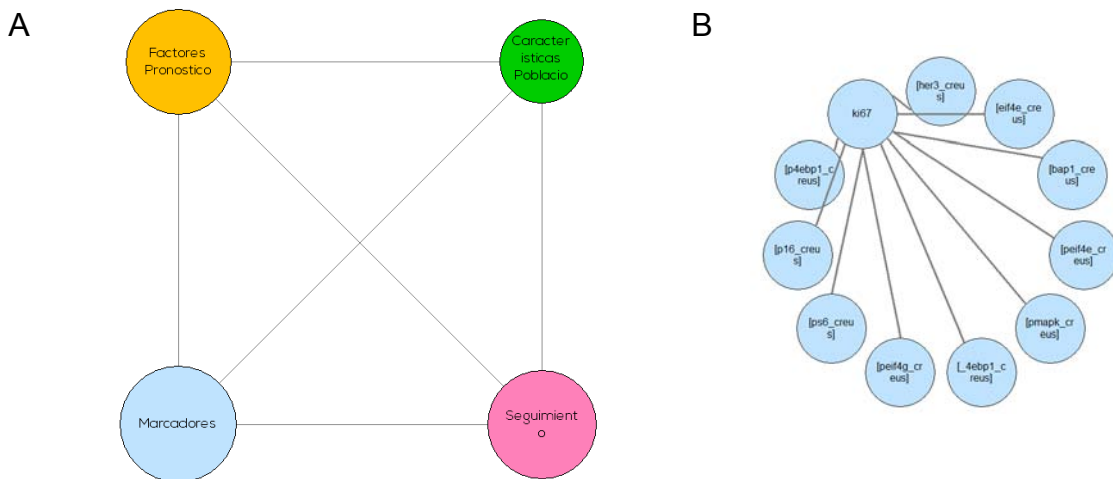


Figura 78. A y B. Ejemplos de mapa de descubrimientos, “Auto-Discovery”. Fotos del programa

El sistema analiza para cada variable con cuantas puede establecer relaciones y en qué subgrupos se cumplen con mayor fuerza (nivel de intensidad de cada relación indicada con valores porcentuales que significa que a mayores valores absolutos las relaciones son más intensas). Para cada pregunta exploratoria se muestra una lista con las relaciones más relevantes identificadas (ver figura 79).

Indep. Var.	Depend. Var.	From	To	Strength	# Samples	Filter 1 - Variable	Filter 1 - Value	Filter 2 - Variable	Filter 2 - Value	Filter 3 - Variable	Filter 3 - Value	Exclusivity
[her3_creus]	ki67	Alto	Moderado	46 % 8		tmm	T3,N0M0					2. Exclusive relationships at segment.
[p4ebp1_creus]	ki67	Bajo	Alto	54 % 8		tmm	T3,N0M0					2. Exclusive relationships at segment.
[p16_creus]	ki67	Bajo	Alto	45 % 8		tmm	T3,N0M0					2. Exclusive relationships at segment.
[ps6_creus]	ki67	Bajo	Moderado	63 % 9		tmm	T2,N0M0					2. Exclusive relationships at segment.
[peif9g_creus]	ki67	Moderado	Alto	66 % 8		estadiatge	IIA					2. Exclusive relationships at segment.
[_4ebp1_creus]	ki67	Moderado	Bajo	53 % 24		histologia	fusiforme					2. Exclusive relationships at segment.
[pmapk_creus]	ki67	Moderado	Bajo	48 % 21		infiltrado	intenso					1. Most relevant relationships
[p18_creus]	ki67	Bajo	Alto	29 % 38		her3_creus	Bajo					2. Exclusive relationships at segment.
[p4ebp1_creus]	ki67	Bajo	Alto	41 % 57		inv_nervi_optic	no					2. Exclusive relationships at segment.
[_4ebp1_creus]	ki67	Bajo	Moderado	67 % 14		ps6_creus	Alto					2. Exclusive relationships at segment.
[peif4e_creus]	ki67	Bajo	Alto	65 % 14		ps6_creus	Alto					1. Most relevant relationships
[ps6_creus]	ki67	Moderado	Alto	85 % 42		_4ebp1_creus	Moderado					2. Exclusive relationships at segment.
[bap1_creus]	ki67	Ausencia	Presencia	32 % 13		_4ebp1_creus	Bajo					2. Exclusive relationships at segment.
[her3_creus]	ki67	Bajo	Moderado	37 % 13		_4ebp1_creus	Bajo					2. Exclusive relationships at segment.
[her3_creus]	ki67	Alto	Bajo	55 % 6		p4ebp1_creus	Alto					2. Exclusive relationships at segment.
[bap1_creus]	ki67	Ausencia	Presencia	18 % 70		peif9g_creus	Bajo					2. Exclusive relationships at segment.
[her3_creus]	ki67	Bajo	Moderado	34 % 31		p16_creus	Bajo					2. Exclusive relationships at segment.
[_4ebp1_creus]	ki67	Moderado	Alto	23 % 42		mtx_a_distancia	no					2. Exclusive relationships at segment.
[_4ebp1_creus]	ki67	Bajo	Alto	24 % 66		os	no					2. Exclusive relationships at segment.
[p4ebp1_creus]	ki67	Alto	Moderado	32 % 65		os	no					2. Exclusive relationships at segment.
[peif4e_creus]	ki67	Bajo	Moderado	78 % 7		pulmo	si					2. Exclusive relationships at segment.
[_4ebp1_creus]	ki67	Bajo	Alto	22 % 71		suprarrenal	no					2. Exclusive relationships at segment.
[p4ebp1_creus]	ki67	Alto	Moderado	33 % 70		suprarrenal	no					2. Exclusive relationships at segment.
[bap1_creus]	ki67	Ausencia	Presencia	24 % 64		cervell	no					2. Exclusive relationships at segment.

Figura 79. Ejemplo de listado con relaciones más relevantes extraídas de un proceso de análisis. Foto del programa.

La interpretación estadística de la “fuerza” depende del tipo de cálculo realizado:

- *Correlaciones numéricas*: aplicado cuando ambas variables son numéricas. El valor absoluto representa el resultado del índice de correlación de Spearman's Rank. El signo de valor representa la dirección de la relación monótonica (creciente o decreciente). Solo se consideran las correlaciones con fuerza absoluta > 80%.
- *ANOVAs*: aplicado cuando una de las variables es cualitativa/categórica y la otra es numérica. El valor representa la diferencia media porcentual entre las diferentes respuestas y la respuesta media de todas las categorías. Solo se consideran las ANOVAs con fuerza > 30%.
- *Contingencias*: aplicado cuando ambas variables son cualitativas/categóricas. El valor representa el resultado del índice de contingencia de Cramer expresado en porcentaje (entre 0% y 100%). Mayores valores indican distribuciones de datos más heterogéneas. Solo se consideran las contingencias con fuerza > 30%.

Con los parámetros introducidos en el sistema, el programa ha evaluado 169568 potenciales relaciones entre variables. Entre ellas se han encontrado 1577 de las cuales 554 son exclusivas. De todas ellas, a continuación, presentamos las de mayor relevancia:

- 1) Los pacientes que tienen metástasis hepáticas, presentan mayor supervivencia cuando así mismo tienen niveles de expresión de p4E-BP1 bajo frente a los que los tienen moderados.

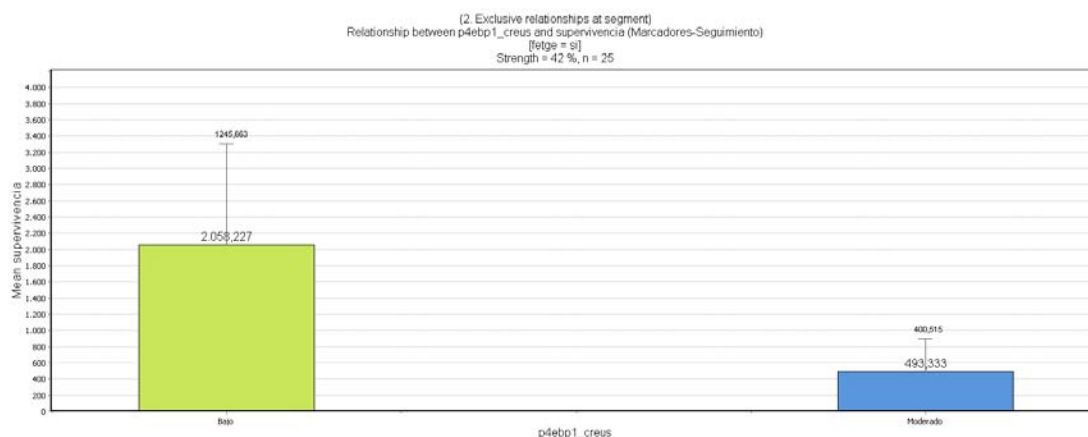


Figura 80. Relación entre p4E-BP1 y supervivencia (hígado=si). Fuerza=42%, n=25

- 2) En el grupo de pacientes con estadio T3cN0M0, aquellos que tienen niveles de expresión altos de p4E-BP1 presentan mayor índice de Ki67 frente a los que tienen nivel de expresión de p4E-BP1 moderado y bajo respectivamente.

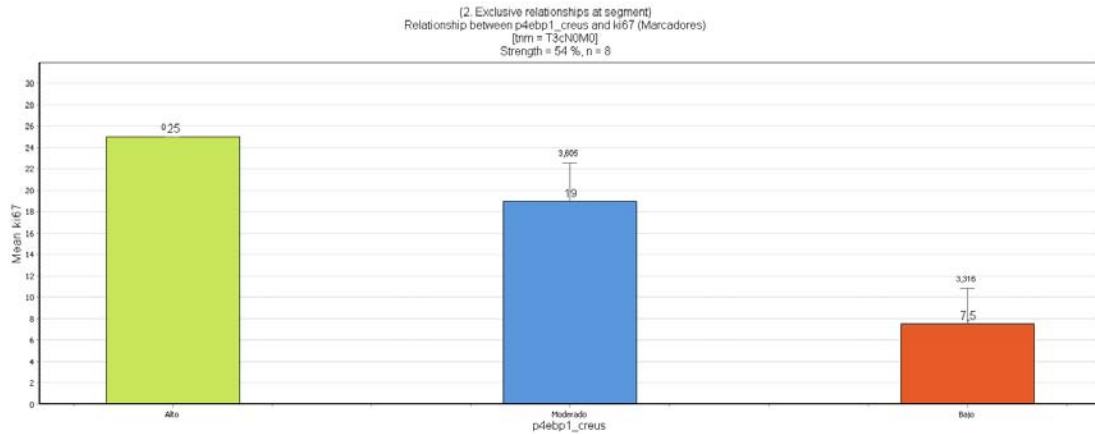


Figura 81. Relación entre p4E-BP1 y Ki 67 (TNM=T3cN0M0). Fuerza=54%, n=8

- 3) Los pacientes con tumores de histología epitelioide, estos presentan mayor índice de mitosis a menor expresión de pS6.

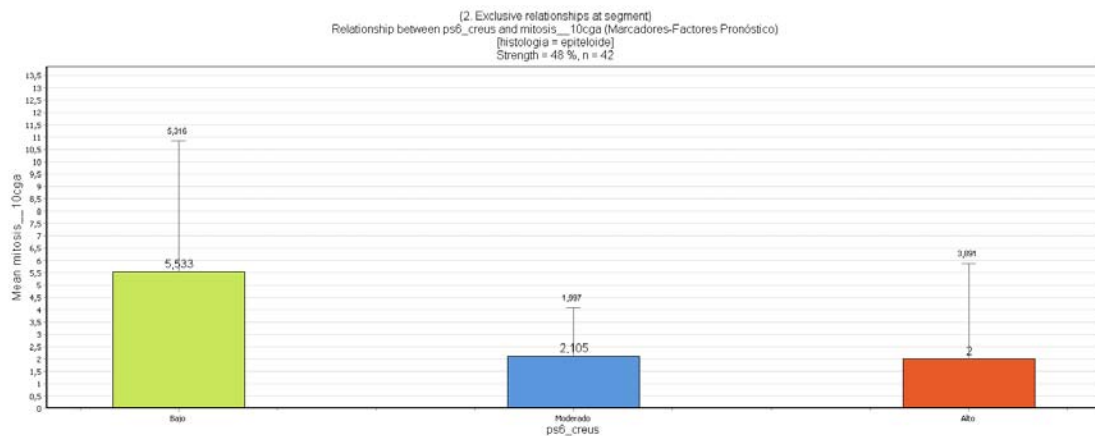


Figura 82. Relación entre pS6 y mitosis/10CGA (Histología=epitelioide). Fuerza=48%, n=42.

- 4) En el grupo de pacientes con expresión de HER3 baja, presentan mayor índice de mitosis aquellos con expresión concomitante de pS6 baja frente a los de expresión moderada y alta.

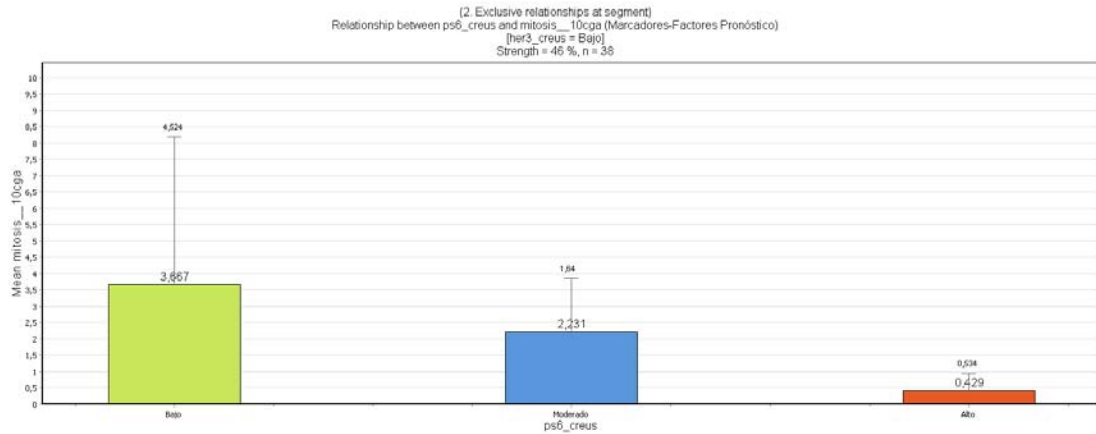


Figura 83. Relación entre pS6 y mitosis/10CGA (HER3=bajo). Fuerza=46%, n=38.

- 5) En los pacientes con niveles de expresión de 4E-BP1 moderada, presentan mayor índice de proliferación (Ki67) aquellos con mayores niveles de expresión de pS6 frente a los de niveles bajos y moderados.

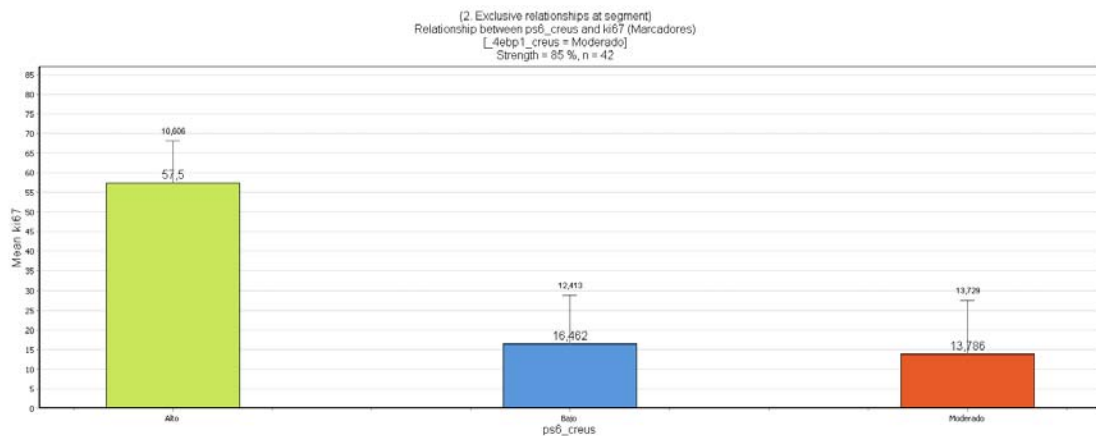


Figura 84. Relación entre pS6 y Ki67 (4E-BP1=moderado). Fuerza=85%, n=42.

- 6) Los pacientes que co-expresan pS6 y p4E-BP1 de intensidad alta, en ausencia de BAP1, tienen mayor índice de mitosis/10 CGA frente a los que tienen BAP1.

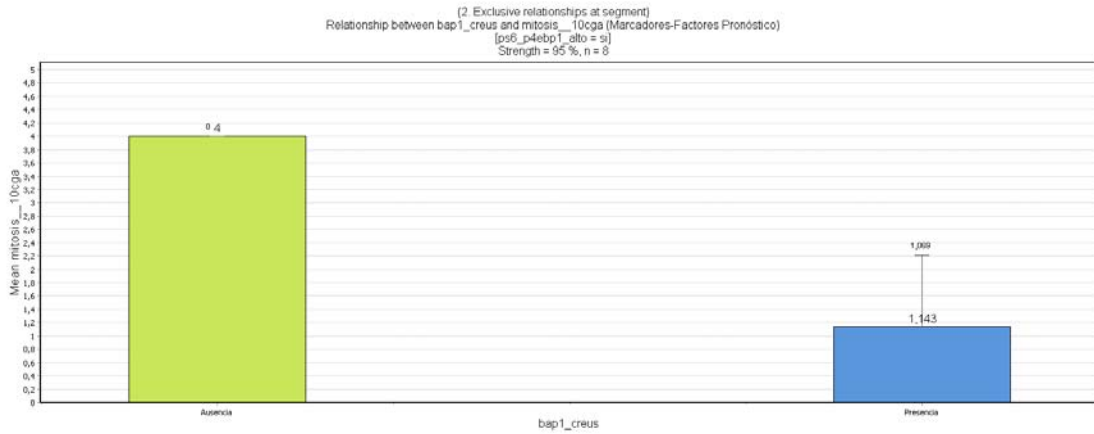


Figura 85. Relación entre BAP1 y mitosis/10CGA (pS6-p4EBP1 alto=si). Fuerza=95%, n=8.

- 7) En los pacientes con P16 bajo, los que muestran ausencia de BAP1 presentan una supervivencia mayor que los que presentan BAP1.

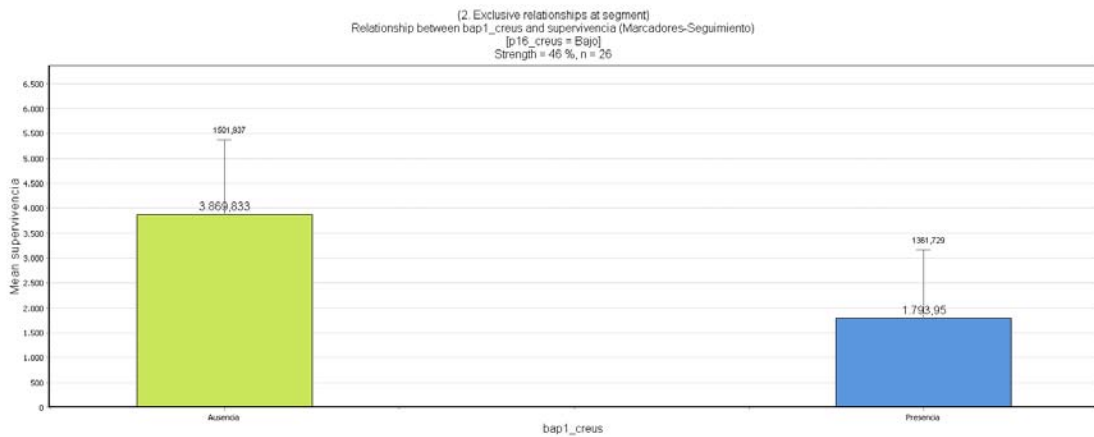


Figura 86. Relación entre BAP1 y supervivencia (P16=bajo). Fuerza=46%, n=26.

5. Ensayo in vitro

5.1. Resultados de la determinación de fármaco a IC50

Los resultados derivados de la determinación IC50 fueron expresados como porcentajes relativos de células viables, para una concentración de compuesto determinada, comparado con los pocillos control. La IC50 que se obtuvo de DTIC y AZD8330 para cada una de las tres líneas celulares de MU fue 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1,75 nM respectivamente. La IC50 de PP242 resultó ser de 0,3125 μM para las líneas de UW1 y MKTBR, y de 0,625 μM para la de OCM1 (ver figura 87).

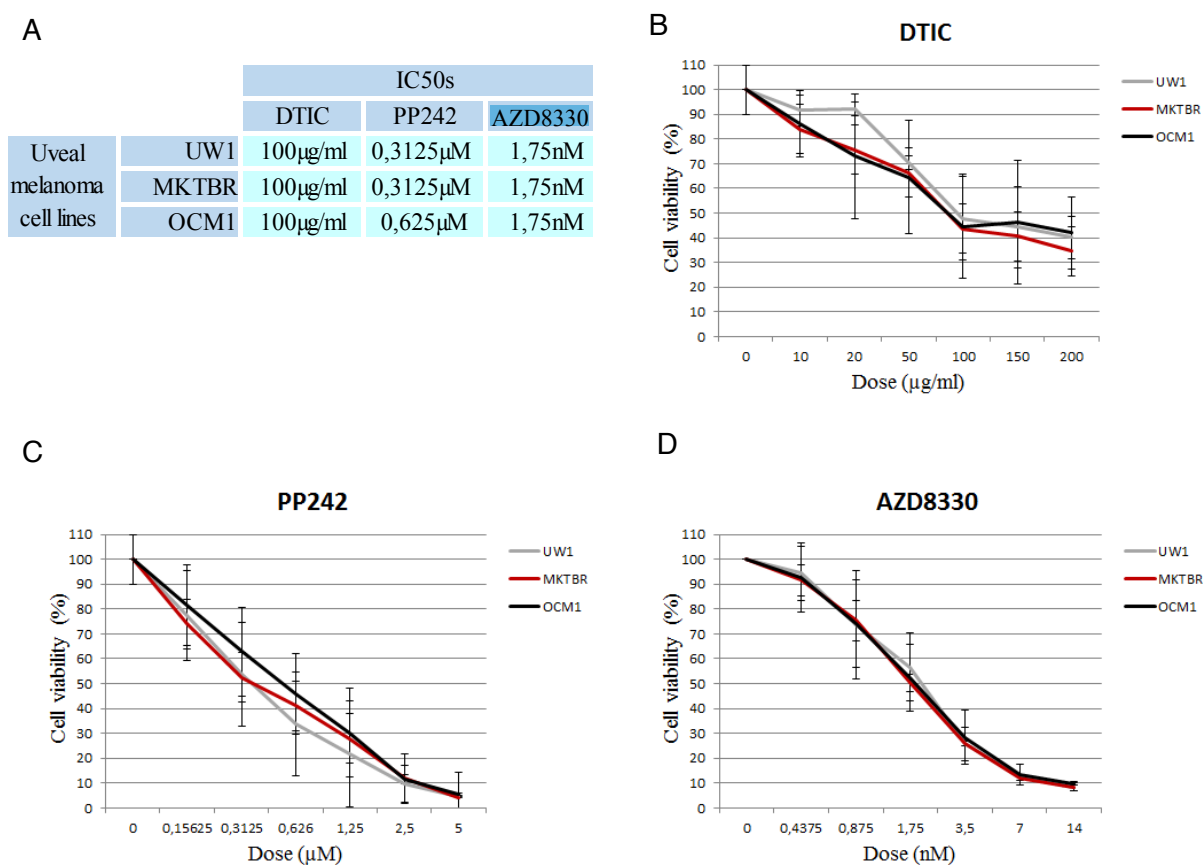


Figura 87. Determinaciones de IC50. A. Tabla resumen de la IC50 para cada línea celular y fármaco testado. B, C y D. Efecto dosis-toxicidad de DTIC, PP242 y AZD8330 para las determinaciones de IC50. B. La IC50 de DTIC fue aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$ para UW1, MKTBR y OCM1. C. La IC50 de PP242 se determinó en 0,3125 μM para UW1 y MKTBR y el doble para OCM1, 0,625 μM . D. La IC50 de AZD8330 fue de 1,75 nM para las tres líneas celulares.

5.2. Resultados de la combinación de fármacos

Los ensayos preclínicos y clínicos en fase I/II nos han proporcionado las bases para evaluar los inhibidores de las vías de señalización de mTOR y MAPK como fármacos para el tratamiento del cáncer, incluyendo el MU. En base a estos, hemos examinado el efecto de PP242, (inhibidor de mTORC1 y mTORC2), de AZD8330 (inhibidor de MEK1/2), y de DTIC (fármaco quimioterápico común), y sus posibles combinaciones en las líneas celulares de MU, evaluando sus efectos sinérgicos en cuanto a la viabilidad celular y la capacidad de formación de colonias así como el tamaño medio en presencia de dichas drogas.

5.2.1. Resultados de la viabilidad celular y ensayo de formación de colonias para combinaciones de fármacos en UW1

Los resultados del índice de combinación (CI) en los tratamientos combinados en la línea celular de UW1 están representados en la figura 88 A y B. El tratamiento con DTIC más PP242 en las células de UW1 mostró un CI superior a 1, lo cual implica un efecto inhibitorio antagonista. Además, los valores de CI fueron más altos cuando más alto era el porcentaje de inhibición obtenido, indicando que a mayor nivel de inhibición el efecto antagónico de DTIC más PP242 es mayor. Los tratamientos combinados de (DTIC + PP242) y (PP242 + AZD8330) mostraron un CI inferior a 1, demostrando el efecto sinérgico de tales combinaciones en UW1. Además, estas combinaciones sinérgicas mostraron una disminución de CI cuanto mayor era la inhibición alcanzada, lo que significa que a mayor nivel de inhibición, mayor es el efecto de sinergia. La combinación con todos los fármacos mostró niveles de CI menores en los puntos de mayor inhibición, presentando un efecto antagonista (CI mayor a 1) en el nivel de IC50 y un efecto sinérgico (CI menor a 1) en el nivel IC75 y IC90.

El efecto de la combinación de fármacos no solo se determinó mediante viabilidad celular sino también con ensayos de formación de colonias mediante el conteo de CFU y con el tamaño. Las CFU contadas en los tests de tratamientos combinados, en las células de la línea UW1, disminuyeron, en comparación con los tests de tratamientos con un sólo fármaco, solamente en la combinación de DTIC+PP242 (ver figura 88 C, D, E, F).

Los valores numéricos del conteaje de CFU y el promedio relativo del tamaño de CFU se detallan en la figura 92.

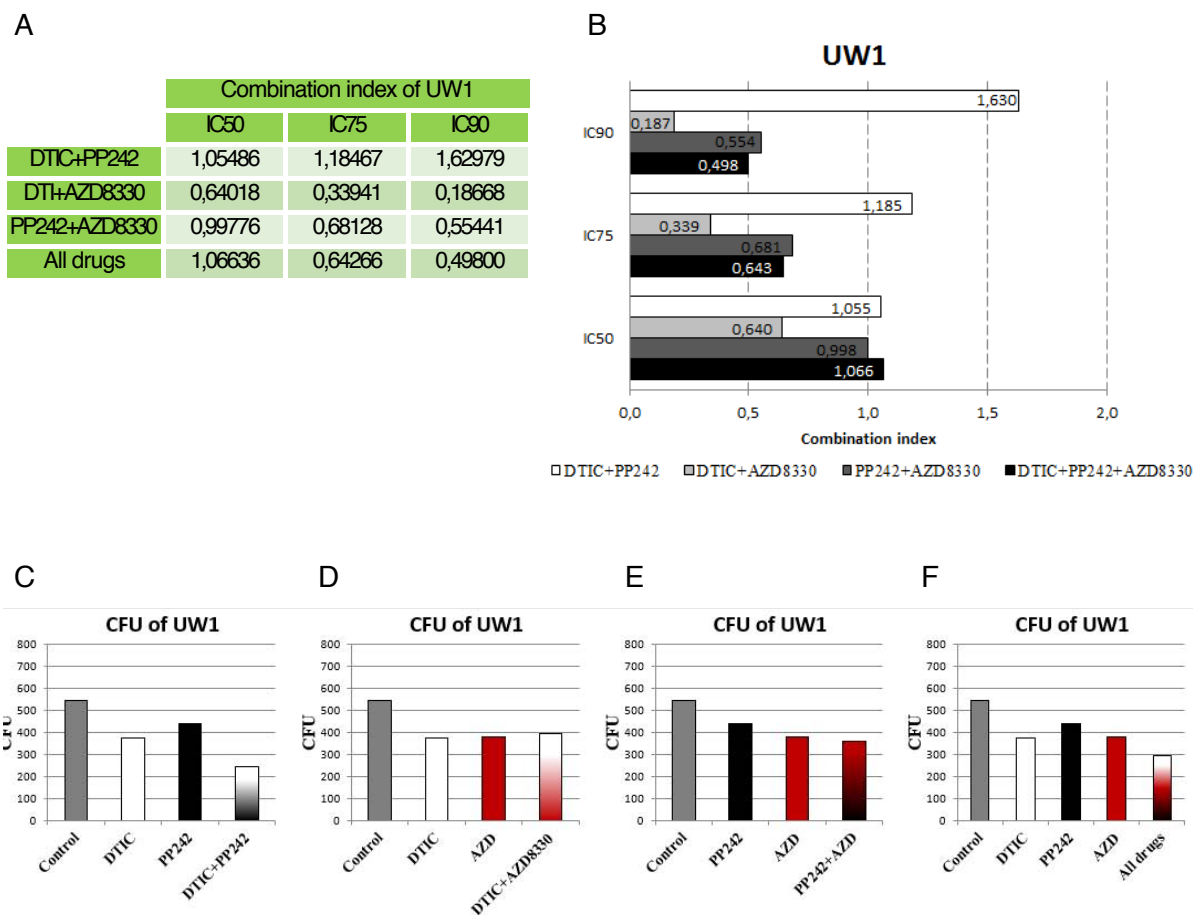


Figura 88. Resultados de la combinación de fármacos en UW1. (A) Tabla resumen de los valores de CI en UW1 cuando se tratan con distintos fármacos a diferentes ICs (IC50, IC75 e IC90). (B) Representación gráfica de los valores de CI necesarios para inhibir el crecimiento celular al 50% (IC50), 75% (IC75) o al 90% (IC90) para todas las combinaciones de fármacos con DTIC, PP242 y AZD8330. $CI > 1$ significa antagonismo y $CI < 1$ sinergismo. (C, D, E i F) Representación gráfica de las UFC para cada tratamiento de combinación de fármacos; (C) DTIC+PP242, (D) DTIC+AZD8330, (E) PP242+AZD8330, (F) combinación de todos los fármacos. Cada gráfico compara las UFC contabilizadas en el control con la combinación de fármacos y con los fármacos de la combinación como agentes únicos.

5.2.2. Resultados de la viabilidad celular y ensayo de formación de colonias para combinaciones de fármacos en MKTBR

Los resultados del CI en los tratamientos combinados en la línea celular de MKTBR están representados en la figura 89 A y B. Los tratamientos combinados con dos fármacos (DTIC+PP242, DTIC+AZD8330 y PP242+AZD8330), en la línea celular de MKTBR, resultaron sinérgicos en cualquier punto de inhibición (IC50, IC75 e IC90) ya que todos ellos mostraron CI menores a 1 y disminuían a medida que IC aumentaba. Por lo tanto la sinergia de los tratamientos combinatorios dual, en células de la línea MKTBR, aumenta a mayores niveles de inhibición de la viabilidad celular obtenida para esta línea. La combinación con todos los fármacos mostró niveles de CI<1 en los puntos de inhibición superiores (IC75 e IC90) no así en el IC50 donde poseen un efecto aditivo CI=1. Las CFU contadas de los ensayos de formación de colonias de la línea MKTBR no mostraron una disminución, en comparación con los tratamientos de fármacos individuales (figura 89 C, D, E y F). Los valores numéricos del conteo de CFU y el promedio relativo del tamaño de CFU se detallan en la figura 92.

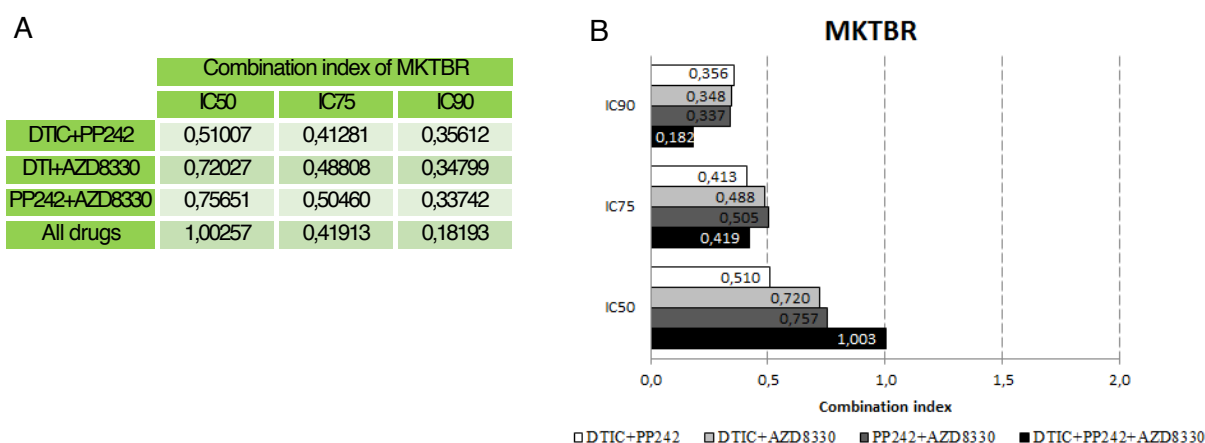


Figura 89 A y B. Resultados de la combinación de fármacos en MKTBR. (A) Tabla resumen de los valores de CI en MKTBR cuando se tratan con distintos fármacos a diferentes ICs (IC50, IC75 e IC90). (B) Representación gráfica de los valores de CI necesarios para inhibir el crecimiento celular al 50% (IC50), 75% (IC75) o al 90% (IC90) para todas las combinaciones de fármacos con DTIC, PP242 y AZD8330. CI>1 significa antagonismo y CI<1 sinergismo.

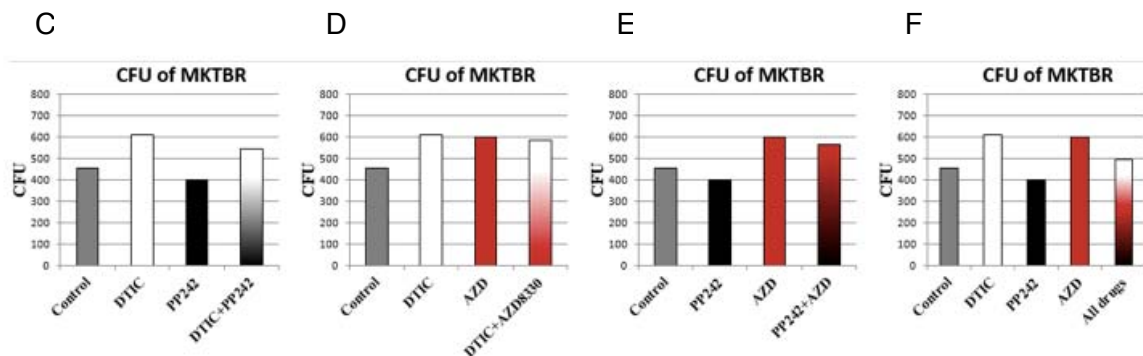


Figura 89. C, D, E y F. Representación gráfica de las UFC para cada tratamiento de combinación de fármacos; (C) DTIC+PP242, (D) DTIC+AZD8330, (E) PP242+AZD8330, (F) combinación de todos los fármacos. Cada gráfico compara las UFC contabilizadas en el control con la combinación de fármacos y con los fármacos de la combinación como agentes únicos.

5.2.3. Resultados de la viabilidad celular y ensayo formación de colonias para combinaciones de fármacos en OCM1

Los resultados del CI en los tratamientos combinados en la línea celular de OCM1 están representados en la figura 90 A y B. OCM1 presentó un CI sinérgico (CI menor a 1) solamente a IC50 y IC75 cuando se trataron con la combinación DTIC+PP242. La combinación de fármacos DTIC+AZD8330 tuvo efectos antagónicos (CI mayor a 1) cuando el nivel de inhibición de la viabilidad celular era del 50%, pero a IC75 el CI disminuía todavía con efecto antagónico y finalmente a IC90 disminuía más, siendo menor a 1, con efecto sinérgico. La combinación de los dos inhibidores PP242 y AZD8330 en la línea OCM1 fue sinérgica a los puntos de inhibición de IC50, IC75 y la tendencia era tener mejores resultados sinérgicos al alcanzar puntos de inhibición menores. Finalmente la combinación de todos los fármacos fue la única que obtuvo un efecto sinérgico en todos los puntos de inhibición (IC50, IC75 y IC90), en esta línea celular, y su tendencia era la de mostrar mejores resultados sinérgicos a los puntos de inhibición alcanzados menores.

Las CFU contadas, resultantes de la aportación de tratamientos con combinación de fármacos a la línea de OCM1, no pareció que disminuyeran en comparación con los tratamientos de un sólo fármaco (figura 90 C, D, E, y F).

Los valores numéricos del conteo de CFU y el promedio relativo del tamaño de CFU se detallan en la figura 92.

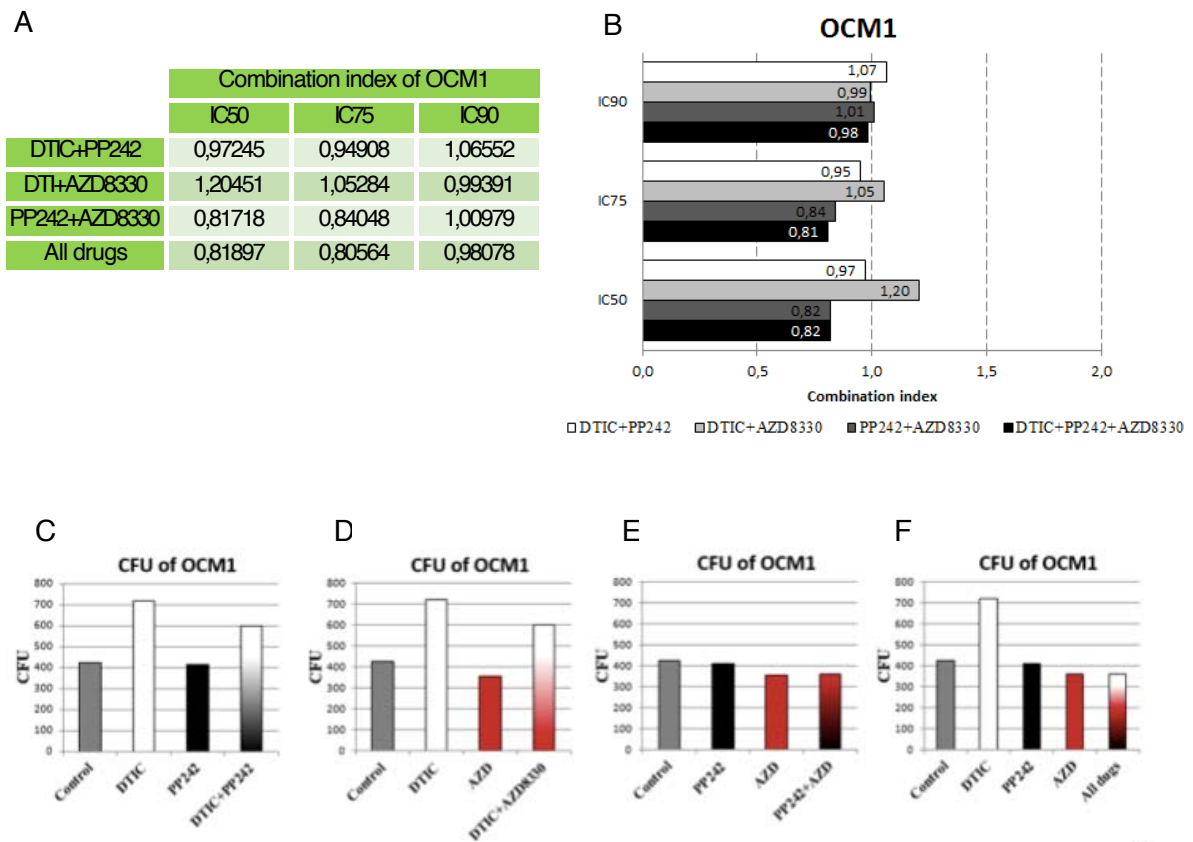


Figura 90. Resultados de la combinación de fármacos en OCM1. (A) Tabla resumen de los valores de CI en MKTBR cuando se tratan con distintos fármacos a diferentes ICs (IC50, IC75 e IC90). (B) Representación gráfica de los valores de CI necesarios para inhibir el crecimiento celular al 50% (IC50), 75% (IC75) o al 90% (IC90) para todas las combinaciones de fármacos con DTIC, PP242 y AZD8330. $CI > 1$ significa antagonismo y $CI < 1$ sinergismo. (C, D, E y F) Representación gráfica de las UFC para cada tratamiento de combinación de fármacos; (C) DTIC+PP242, (D) DTIC+AZD8330, (E) PP242+AZD8330, (F) combinación de todos los fármacos. Cada gráfico compara las UFC contabilizadas en el control con la combinación de fármacos y con los fármacos de la combinación como agentes únicos.

5.3. Proliferación basal, migración y habilidad para formación de colonias de UW1, MKTBR y OCM1

Para poder determinar la capacidad de proliferación, migración y formación de colonias de las células de UW1, MKTBR y OCM1 en su estado basal, se efectuaron diferentes ensayos. Los ensayos de proliferación, obtenidos como curvas de nivel de duplicación de la población (PDLs) a partir del valor de duplicación de la población (PD) acumulativas, resultaron muy similares para las tres líneas celulares. Los PDs acumulativos en los pasos 1, 2 y 3 para UW1 fueron consecutivamente 2.80, 4.82 y

8.18. Los PDs acumulativos en los pasos 1, 2 y 3 para MKTBR fueron 2.82, 5.26 y 8.81 respectivamente. OCM1 presentó una PD de 2.56 en el paso 1, 4.75 en el paso 2 y 8.19 en el paso 3 (figura 91 A).

Los resultados de “Wound Healing” los cuales evaluaron la capacidad de migración celular se expresaron como la “herida” relativa abierta en comparación con la “herida” inicial. El porcentaje de apertura (separación entre las células) de la “herida” abierta a las 24 horas era de 89.03%, 85.27% y 90.74% para UW1, MKTBR y OCM1 respectivamente. A las 48 horas, UW1 tenía una “herida” abierta de 83.44%, MKTBR del 79.36% y OCM1 del 80,51% (figuras 91 C y D). La capacidad de migración celular fue bastante similar.

Los resultados de la capacidad de formación de colonias en cada línea celular sin ningún tratamiento se expresó como el número total de CFU contadas. Para UW1 fueron 547, para MKTBR fueron 455 y para OCM1 425 (figura 91 B).

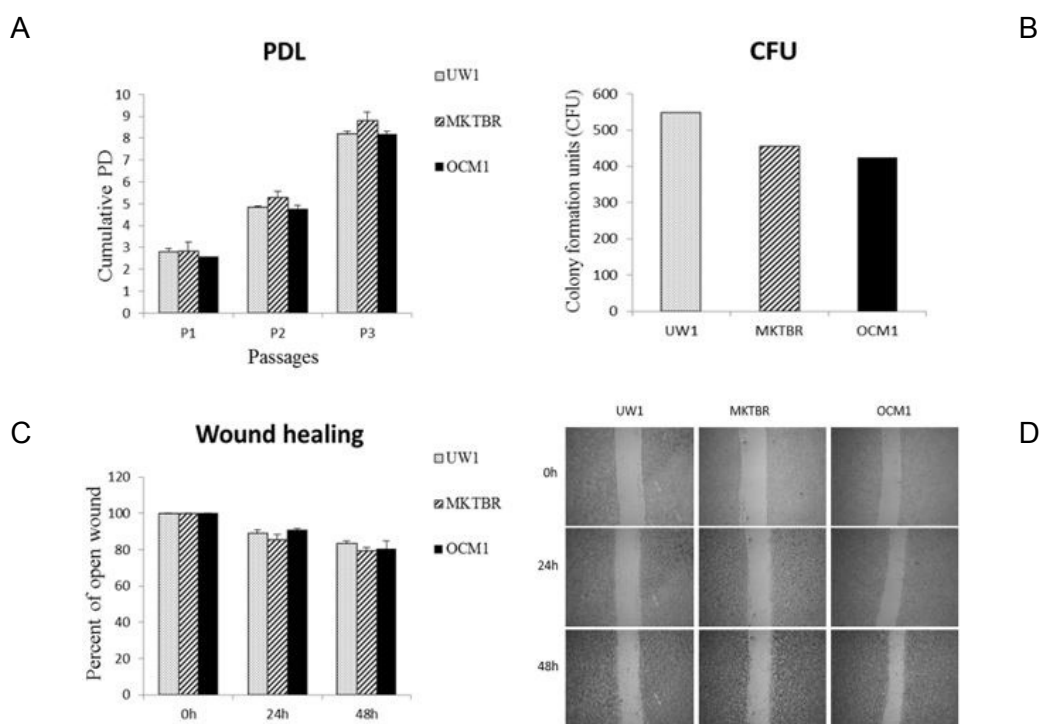


Figura 91. Proliferación basal, habilidad de formación de colonias y de migración de UW1, MKTBR y OCM1. (A): Gráfico PDL que compara los PDs acumulados obtenidos para las tres líneas celulares; UW1, MKTBR y OCM1 en los pasos 1, 2 y 3. Ambas líneas celulares muestran PD acumulativas similares en cada pasaje. (B): Gráfico UCF, representación del número total de UFC contadas en las tres líneas celulares. (C): Gráfico Wound Healing, compara el porcentaje de apertura de la brecha entre UW1, MKTBR y OCM1 a las 0 h, 24 h, y 48 h. Ambas líneas presentan un cierre similar de la

brecha. (D): Fotografías de los ensayos de wound healing tomadas a las 0 h, 24 h y 48 h, para UW1, MKTBR y OCM1 que demuestran un cierre progresivo de la brecha.

Los valores numéricos del contejo de CFU y el promedio relativo del tamaño de CFU se detallan en la figura 92.

A			B			C		
UW1			MKTBR			OCM1		
Treatment	CFU countig	Relative average CFU size (%)	Treatment	CFU countig	Relative average CFU size (%)	Treatment	CFU countig	Relative average CFU size (%)
Control	547	100,00	Control	455	100,00	Control	425	100,00
DTIC	374	56,66	DTIC	610	124,62	DTIC	720	90,30
PP242	438	102,56	PP242	399	103,66	PP242	411	91,14
AZD	381	91,85	AZD	599	88,00	AZD	358	80,06
DTIC+PP242	246	46,27	DTIC+PP242	548	101,47	DTIC+PP242	600	76,16
DTIC+AZD8330	397	55,50	DTIC+AZD8330	585	128,05	DTIC+AZD8330	600	76,16
PP242+AZD	361	50,70	PP242+AZD	566	74,88	PP242+AZD	360	60,99
All drugs	295	38,81	All drugs	496	80,69	All drugs	358	44,95

Figura 92. Valores del contejo de CFU y del promedio relativo de su tamaño para cada línea celular (A, B, C). Las tablas resumen el número total de CFU y su tamaño medio relativo cuando se comparan los controles con cada uno de los tratamientos administrados en cada una de las tres líneas celulares: UW1 (A), MKTBR (B) y OCM1 (C).

VIII. DISCUSIÓN

VIII. DISCUSIÓN

El MU es un tumor del cual sabemos poco si lo comparamos con otras neoplasias, quizás uno de los motivos sea su baja incidencia lo cual dificulta el estudio del mismo en series amplias de casos. Aún así, han sido muchos los grupos de profesionales que han dirigido sus esfuerzos a conocer más sobre su biología y su comportamiento en el ser humano, con el fin de categorizarlo según su progresión y evolución para poder identificar de antemano aquellos casos que van a presentar un peor pronóstico. Inicialmente, los estudios realizados se focalizaron en determinar cuáles eran los factores que nos permitían dicha clasificación pronóstica y en los últimos años, con los conocimientos de biología molecular, se ha profundizado en esta línea además de intentar determinar si alguno de ellos actuaría como diana terapéutica a fin de ofrecer un tratamiento más adecuado a cada paciente.

En el presente trabajo se ha podido validar, el significado pronóstico que tienen algunas de las variables clínicas en consonancia con los estudios previos ya publicados, donde cabe destacar algunas de ellas:

En relación con la edad hemos encontrado una asociación pronóstica desfavorable en edades avanzadas de acuerdo con Shields (47) y el grupo Europeo de Patología Oftálmica (56) pero además, en nuestra serie, hemos establecido un punto de corte a los 48 años, a partir del cual, en los mayores a esa edad, el riesgo de metástasis y de muerte por enfermedad es mayor y la supervivencia global a los 10 años menor. En nuestra serie el sexo no parece tener relevancia pronóstica, al contrario de lo que concluyeron Zloto y colaboradores (48).

En el presente estudio, la localización del tumor ha sido un parámetro de difícil valoración puesto que en la serie de casos sobre la que hemos trabajado la representación de melanomas de iris y cuerpo ciliar es muy inferior a los de coroides. Aún así, comparando entre los melanomas de localización coroidea y no coroidea, se ha observado un peor pronóstico en los que no estarían localizados en la coroides en relación a la supervivencia libre de metástasis y el riesgo de muerte por enfermedad. Este resultado es ambiguo, ya que el melanoma de iris se ha descrito con un mejor pronóstico (44) y queda incluido en el grupo de “no coroides” a consecuencia de que la representación de los mismos no es del todo equilibrada (en

nuestra serie, solo hay 1 caso de melanoma primario de iris con más de 10 años de supervivencia). Si observamos la supervivencia global, se han podido comparar los grupos de melanoma en la coroides y en el cuerpo ciliar viendo que la supervivencia estimada a los 10 años es menor en los de cuerpo ciliar, resultado acorde con publicaciones previas (44).

Al igual que en estudios anteriores (44), en el nuestro el tamaño del tumor también se asocia al pronóstico de forma significativa. A pesar de que Mc Lean ya en el año 1977 constató que el diámetro basal del tumor era un parámetro mejor que el volumen para valorar la relación pronóstica con el tamaño (57) (puesto que los tumores de configuración difusa presentando un menor volumen poseen un peor pronóstico (54)). En nuestro caso hemos valorado el tamaño tumoral de todos los casos (en calidad de su volumen), ya que en nuestra serie había muy poca representación de tumores de configuración difusa (1 caso). Aún teniendo dos puntos de corte, derivados de las diferentes curvas ROC, (100 mm³ asociado a una menor supervivencia libre de metástasis y 150 mm³ asociado a una menor supervivencia libre de muerte por enfermedad y supervivencia global), el resultado final muestra que de manera global los tumores de mayor volumen se asocian a un peor pronóstico de una manera estadísticamente significativa. Adicionalmente hemos valorado el estadiaje. En nuestra serie no hemos encontrado una asociación significativa entre dicho estadio inicial y el pronóstico probablemente debido a la gran variedad de grupos a analizar, algunos de los cuales poseen muy pocos casos, pero sí hemos observado que en los pacientes que se presentan con un estadiaje inicial avanzado, el riesgo de desarrollar metástasis y de muerte por enfermedad son mayores y presentan una menor supervivencia global. Así pues, este resultado estaría en la línea del de Shields CL (40).

En cuanto a las variables histológicas recogidas en la introducción, hemos procedido a valorar el tipo celular, la actividad mitótica, el patrón vascular, el infiltrado inflamatorio linfocitario, la necrosis y la pigmentación. Los resultados obtenidos demuestran que, en nuestra serie, se cumplen las asociaciones de estas con el pronóstico previamente publicadas.

También se han valorado el estado de la retina y la invasión del nervio óptico sin hallar relación pronóstica alguna con estos parámetros. Tampoco se han observado asociaciones pronósticas con la presencia de necrosis ni de pigmentación en

nuestra serie. Resultados que discrepan de los anteriormente publicados (19, 87), pero que son tributarios a una valoración relativa ya que tanto la necrosis como la pigmentación se asocian al tamaño tumoral, tipo celular y a la presencia de macrófagos asociados al tumor (19), sin que hayan suficientes publicaciones que abalen su implicación en el pronóstico como factores independientes. No hemos identificado ninguna asociación del patrón vascular con el pronóstico como Lane y colaboradores (63) que lo estudiaron en una serie de 63 casos en 1997. Este resultado ha sido rebatido por las aportaciones del grupo de Tero Kivelä, que en 1999 publicaron dos trabajos en donde se establecía el valor pronóstico del patrón y la densidad vascular como factores independientes en series más amplias (65, 66). A pesar de que nosotros no hayamos podido objetivar el valor pronóstico del patrón/densidad vascular en nuestra serie, queda demostrada su importancia tanto a nivel de la génesis tumoral (130) como en la predisposición a metastatizar del tumor, debido a que la vía hematogena es la única vía de siembra tumoral a distancia, puesto que el ojo carece de linfáticos (162).

En referencia al tipo histológico, aunque hemos visto que los pacientes con histología epitelioide poseen un mayor riesgo de muerte por enfermedad así como un tiempo estimado libre de metástasis y una supervivencia global a los 10 años menor que los de histología mixta y fusiforme respectivamente, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas. La tendencia que se observa en estos grupos es similar a los resultados publicados (38).

En cuanto al índice de mitosis, en el presente estudio se han valorado el número de mitosis en 10 CGA, esta metodología difiere a la utilizada en otras publicaciones en las que el conteo se realiza en 40 CGA (57, 59). Por otro lado, no hemos tenido en cuenta las áreas mitóticamente más activas como hizo Lattman en su trabajo (58), contando en el presente estudio las mitosis en campos seleccionados al azar. En algunas publicaciones se ha descrito la presencia de 8 mitosis en 40 CGA como un factor de mal pronóstico (57), en nuestro caso hemos observado que pacientes con más de 2 mitosis en 10 CGA tienen un mayor riesgo de desarrollar metástasis ($p=0,001$), y que en aquellos con más de 4/10CGA, existe un mayor riesgo de muerte por enfermedad ($p=0,002$) y menor supervivencia global a los 10 años ($p<0,001$). Ya que nuestros valores son en 10 campos y no en 40, si realizáramos una estimación de los mismos en 40 campos multiplicando por 4 nuestros valores,

estaríamos en la línea de los valores publicados. Por lo tanto, en la serie de casos que hemos analizado también se cumple que los tumores que más proliferan (más mitosis) tienen peor pronóstico.

El infiltrado inflamatorio linfocitario intenso ha demostrado ser un factor de peor pronóstico en nuestra serie, ya que su presencia se asocia a un mayor riesgo de metástasis ($p=0,005$), mayor riesgo de muerte por enfermedad ($p=0,015$) así como una supervivencia global a los 10 años disminuida ($p=0,054$). No obstante, su interpretación y valoración en el presente estudio es un punto débil debido a su poca reproducibilidad, puesto que no se ha utilizado una medición objetivable como la propuesta por de la Cruz (77) quien estableció dos grupos de infiltrado, “bajo” aquellos con menos de 100 linfocitos por 20 CGA y “alto” en los que se contaban más de 100 linfocitos en 20 CGA. Por otro lado se ha valorado el infiltrado inflamatorio linfocitario sin tener en cuenta el componente macrofágico del mismo. Aún así, nuestros resultados, aunque no han mostrado ser estadísticamente significativos, son acordes con los publicados en la literatura (77, 78, 80, 84) y reflejan la importancia que tiene el microambiente inflamatorio tumoral en el melanoma uveal como propuso Hanahan y Weinberg para el cáncer en general (131).

Cabe destacar que los marcadores anteriormente descritos han mostrado su potencial valor pronóstico tanto en los análisis univariantes como en los análisis multivariantes realizados, confirmando por ello su papel fundamental en el pronóstico del MU.

En el análisis de los marcadores de señalización estudiados en el trabajo (“signaling”) y asociados con variables clínicas destacan varios de ellos; Ki67, P16, pMAPK, pS6, y 4E-BP1.

Ki67 se ha visto asociado a la presencia de mitosis de forma estadísticamente significativa ($p=0,001$), lo cual es esperable sabiendo que la presencia de mitosis refleja el estado proliferativo de las células y que una de las formas de objetivarlo es mediante técnicas de IHQ (59, 61). En nuestra serie, como en la de Mooy (61) y la de Al-Jamal (74), valores altos de Ki67 se asocian a un peor pronóstico, siendo una variable independiente para predecir la supervivencia global y la mortalidad por enfermedad. Se ha establecido un punto de corte en 22 núcleos positivos/CGA, a

partir del cual se observa una disminución de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a los 10 años para valores más altos de dicho umbral. También hemos observado una tendencia a que los pacientes con Ki67 alto (>22 núcleos positivos/CGA) posean un mayor riesgo de metástasis, sin poder hallar diferencias estadísticamente significativas como han encontrado en algún trabajo (74). Igual que en otras publicaciones (61,74) también en nuestra muestra los tumores de histología epitelioide tienen valores más altos de Ki67. Hemos observado que Ki67 se asocia de forma significativa con el patrón vascular ($p=0,003$) en nuestra serie, de forma que patrones vasculares complejos poseen niveles de Ki67 más altos que los patrones simples o normales. Este es un punto interesante ya que, a pesar de no observar significación pronóstica en el patrón vascular, se podría pensar que tumores que están proliferando, y por lo tanto creciendo, requieren de una aportación vascular más compleja y rica. No obstante, en este contexto esperaríamos encontrar una asociación entre la expresión de Ki67 y el volumen tumoral que no hemos encontrado. De esta forma, con los datos obtenidos en nuestra serie, serían los tumores de histología epitelioide los que, independientemente de su tamaño, proliferarían más y desarrollarían una trama vascular más compleja.

Otro de los marcadores de ciclo celular que se asocia con variables clínico-histológicas ha sido P16. Los valores de intensidad de expresión bajos-moderados de P16, se asocian con un mal pronóstico, siendo variable independiente de supervivencia global y riesgo de muerte por enfermedad. Este resultado también es esperable dado que la función de P16 es la de detener la progresión del ciclo celular en la fase G1/S, así que la pérdida de función del mismo conduce a una proliferación celular no regulada lo cual junto a los resultados que hemos obtenido de Ki67 nos indican que en nuestra serie de MU también exista una desregulación de la sensibilidad de señales anti crecimiento que pasa por la pérdida de función de P16 acorde con las publicaciones previas (138). También hemos observado que los casos con expresión moderada o baja de P16 presentan un infiltrado inflamatorio intenso. Esta asociación permite plantearnos si en el MU sucede igual que en el melanoma cutáneo como describió Huang en 2004, el cual mediante su trabajo confirmó la hipótesis de que los linfocitos T eran capaces de reconocer productos

resultantes de una alteración en la transcripción de ciertos genes (neoantígenos) con lo que podían mediar potentes respuestas antitumorales in vivo. Este resultado lo llevó a identificar epítomos que podían ser codificados cerca de las regiones de *CDKN2A* (171). Contrariamente a lo expuesto, en nuestro trabajo la presencia de infiltrado inflamatorio intenso, lejos de mediar una respuesta inmunológica citotóxica antitumoral, se ha asociado a un mal pronóstico. Ribas, en una de sus publicaciones sobre melanoma cutáneo, plantea el concepto de “resistencia inmune adaptativa” como un proceso en donde el cáncer cambia su fenotipo para evadir y combatir a la respuesta inmune pro-inflamatoria o citotóxica. Este proceso adaptativo se activa mediante el reconocimiento específico que hacen los linfocitos T a las células cancerígenas lo cual conduce a la producción de citoquinas que activan y promueven la respuesta inmune. Las células cancerígenas utilizan mecanismos desarrollados para limitar la respuesta inflamatoria e inmune y así protegerse contra el ataque de las células T (172). Yang concluyó que el MU también utilizaría la expresión de PD-L1 para regular la función de los linfocitos T a través de la supresión de la producción de IL-2 como mecanismo de evasión del sistema inmune, en un estudio realizado en líneas celulares de MU (176). Inhibir la resistencia inmune adaptativa de las células neoplásicas podría ser la base del mecanismo de las respuestas a los anticuerpos bloqueantes PD-1 o PD-L1 pudiendo ser clave para el desarrollo de otras estrategias de inmunoterapia contra el cáncer y el MU (172, 176). Aun que de manera independiente valores de Ki67 >22 núcleos positivos/CGA y intensidad de expresión de P16 baja-moderada actúan como variables independientes de mal pronóstico, es interesante lo que hemos observado cuando combinamos ambas variables ya que juntas permiten predecir de manera más precisa el riesgo de muerte por enfermedad con un VPP del 77,8% y un VPN del 74,2%.

De los resultados obtenidos también hemos observado que tanto pMAPK como pS6 y 4E-BP1 se han asociado con el volumen tumoral. Para pMAPK y pS6 la relación establecida es inversa: a mayor volumen, menores niveles de expresión de pMAPK y de pS6. De la asociación de 4E-BP1 con el volumen ($p < 0,001$), hemos constatado que a menor volumen mayores niveles de expresión de 4E-BP1. Tanto las vías de MAPK como mTOR están involucradas en el crecimiento y la proliferación celular y

ambas pueden activar la traducción y síntesis de proteínas fundamentalmente a través de la activación de 4E-BP1 como de S6. En base a los datos obtenidos se podría plantear que para el crecimiento del MU la vía que estaría más implicada sería la de mTOR, ya que tenemos niveles de expresión bajos de pMAPK en tumores de volumen mayor, y sería a través de la activación 4E-BP1 y no de S6 que se activaría la síntesis traducción de proteínas. Para confirmarlo esperaríamos encontrar que niveles de EIF4E y de p4E-BP1 estarían bajos en aquellos casos de tumores de menor volumen cosa que no hemos podido demostrar en nuestra serie. Aún así en el análisis detallado de las variables realizado mediante AutoDiscovery si que hemos observado una asociación entre p4E-BP1 y Ki67 en los pacientes con estadiaje T3cN0M0. En este grupo de pacientes, los tumores que presentan niveles de p4E-BP1 altos, tienen mayor índice de proliferación. Este resultado nos acercaría a la idea que planteábamos de modo que si el estadiaje del tumor recoge su tamaño en la categoría T, y los T3 representan tumores de gran tamaño, lo cual en nuestra serie asociaríamos con el volumen, los tumores grandes y con más p4E-BP1 serían los que más proliferan dando la idea de que en el crecimiento tumoral la vía de mTOR tendría un papel importante.

De los resultados del análisis estadístico hemos obtenido que la expresión de 4E-BP1 en los tumores de nuestra serie también se asocia de forma significativa con la histología ($p=0,025$) de los mismos de manera que los casos que presentan niveles de expresión de 4E-BP1 más bajos corresponden, en su mayoría, a tumores de histología epitelioide. De esta asociación se podría plantear la hipótesis de que si en los tumores epitelioides hay niveles más bajos de 4E-BP1 total podría ser debido a que hubiese un aumento de 4E-BP1 fosforilado (p4E-BP1) y por lo tanto que estuviese activada la traducción de proteínas vía EIF4E, algo que no podemos confirmar dado que no tenemos asociaciones objetivadas con estos últimos marcadores. Cuando hemos analizado las relaciones que se pudieran establecer entre estas variables mediante el programa AutoDiscovery, el sistema nos ha encontrado varias asociaciones. Es interesante la que se establece entre pS6 y Ki67 en el grupo de pacientes con expresión de 4E-BP1 moderada, en el cual los pacientes que tienen mayores niveles de expresión de pS6 presentan mayores niveles de expresión de Ki67. De ella se extrae el concepto de que es la vía de

mTOR la que estaría implicada en el ciclo celular del tumor en este grupo de muestras. La segunda asociación de variables que nos facilita el análisis con AutoDiscovery es la que nos relaciona p4E-BP1 y supervivencia en el grupo de pacientes con metástasis hepáticas, de manera que, los que tienen menores niveles de expresión de p4E-BP1 tienen una mayor supervivencia. Este resultado respalda la idea de que en los tumores que tienen peor pronóstico, (metastásicos y por lo tanto estadio IV), la vía de mTOR se encontraría activada sin poder decir qué participación tiene la vía de MAPK por falta de datos. Finalmente el análisis con AutoDiscovery nos ha proporcionado una relación entre las variables pS6 y mitosis en el grupo de histología epitelioide. Para esta histología, las muestras que expresan niveles bajos de pS6 tienen más mitosis frente a las que expresan niveles moderados y altos. Cabe comentar que S6 se puede activar por ambas vías de señalización tanto por mTOR como por MAPK con lo que se constata que ambas vías y su interrelación (crosstalk) pueden estar activadas en la histología epitelioide no pudiendo confirmar cual de ellas posee más importancia en este tipo histológico. La única variable estudiada en calidad de receptor de señales hacia la célula ha sido HER3. De su análisis se extrae el resultado de que niveles bajos de expresión de HER3 nos predice un mayor riesgo de metástasis (presentando más del doble de riesgo de desarrollar metástasis durante el seguimiento que en los tumores con niveles de expresión moderados-altos ($p=0,035$) y actúa como variable predictora independiente en nuestra serie. No hemos detectado asociación alguna de HER3 con el tipo histológico del tumor como sí lo vieron Di Cesare y colaboradores (166). Este resultado nos hace pensar que HER3 podría tener un efecto protector en el MU, al igual que concluyó Trocmé (143). En dicho estudio se observó que la expresión de HER3 solamente era factor de buen pronóstico en los casos en los que se presentaba a nivel nuclear sin poder establecer el mecanismo de acción. En nuestra serie no hemos distinguido la localización de la expresión de HER3 (probablemente por haber empleado anticuerpos diferentes) obteniendo el mismo resultado. Tampoco hemos podido establecer si los altos niveles de expresión son debidos a un aumento de representación de la proteína o a un incremento de su función debido a que los reactivos (p-HER3) no han funcionado correctamente. La activación de HER3 se produce cuando este se une a un ligando, a través de la dimerización (unión de HER3 a otros receptores, ya que intrínsecamente este carece

de actividad tirosin-quinasa), bien sean de la familia HER como sucede en cáncer de mama en dónde se une a HER2 (168) o de otras familias como IGF-1R, RET, AXL, FGFR2 y MET (173). El aumento de actividad de HER3 podría ser debido a varios mecanismos: por la presencia aumentada de un ligando, por amplificación/sobreexpresión, por mutaciones (algunas somáticas descritas de forma esporádica en cáncer gástrico y de colon, que confieren un aumento de función, (169)) o por desregulación de la vida media de la proteína a través de ubiquitin ligasas como NEDD4 y NRDP1 (170). Sea cual sea el mecanismo por el que HER3 se encuentra sobreactivado, cabría esperar que el incremento de actividad del receptor (HER3) provocase un incremento de activación de las vías de MAPK y/o PI3K-AKT-mTOR, lo cual se asociaría a un peor pronóstico como se ha descrito en neoplasias malignas de diversos orígenes entre ellos, mama, ovario, próstata, colon, páncreas, gástrico, cavidad oral y pulmón (170). En nuestra serie mayores niveles de expresión de HER3 se asocian a mejor pronóstico, contrariamente a lo que está descrito (170). Se podría plantear que en el MU existiese algún fenómeno que impidiese o compitiese con otros ligandos para bloquear la unión de HER3 a otros receptores dando como resultado su inactivación. Se ha descrito que la sobreexpresión de HER4 posee un papel antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama (174), así mismo se ha asociado a mejor pronóstico en pacientes afectas de cáncer de mama (175). Estaría por determinar si la dimerización de HER3 con HER4 sería posible en MU y si esta unión tendría verdaderamente un papel protector y de mejor pronóstico en él.

Un dato a tener en cuenta es la asociación observada, mediante el análisis de variables con AutoDiscovery, entre pS6 y mitosis en el grupo de pacientes con expresión de HER3 baja, donde los que tienen baja expresión de pS6 tienen más número de mitosis frente a los de expresión de pS6 moderada y alta respectivamente. Estos datos sugieren que la vía de señalización mediada por mTOR a través de S6 no participa en la activación del ciclo celular y podría deberse a una activación de MAPK así como de p4EBP1 de manera independiente de mTOR (bien a través de p38MAPK, LRRK2 u otras quinasas (181)), en aquellos tumores que poseen una baja expresión de HER3. La falta de datos no nos permite profundizar en esta teoría.

A pesar de que mediante el análisis estadístico no hemos podido establecer ninguna asociación con BAP1 y las otras variables del estudio, utilizando el programa de análisis de datos AutoDiscovery hemos buscado explícitamente si BAP1 presentaba asociación con alguna de ellas y el sistema ha encontrado dos asociaciones, siendo una de las variables BAP1, que suponen dos aportaciones contradictorias como se explica a continuación. La primera se ha establecido entre la expresión de BAP1 y la supervivencia en los pacientes con P16 bajo. En ellos, los que muestran ausencia de expresión de BAP1 presentan una supervivencia mayor frente a los que sí la tienen. La lectura de esta relación sería que en el grupo de pacientes en los que hay una pérdida de función de P16 y por lo tanto mayor proliferación celular, cuando sus tumores no expresan BAP1 los pacientes viven más tiempo. En relación a la expresión IHQ de BAP1, Koopmans demostró la asociación entre la ausencia de expresión de BAP1 con la presencia *BAP1* mutado con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97%. Por lo tanto la asociación encontrada por AutoDiscovery en nuestra serie estaría en contradicción con los resultados de dicha autora la cual en su trabajo (121) además de relacionar la expresión IHQ de BAP1 negativa con mutación de *BAP1* ($p < 0.001$), también la relacionó con monosomía 3 ($p < 0.001$) y celularidad epitelioide ($p = 0.001$) y observó que en su serie los pacientes con expresión de BAP1 negativa tenían una supervivencia libre de enfermedad menor si lo comparaba con los de expresión positiva ($p < 0.001$). Así pues parecería que la ausencia de expresión de BAP1 por técnica de inmunohistoquímica sería un marcador de mal pronóstico contrariamente a lo que nos estaría indicando esta primera asociación.

La segunda es en el grupo de pacientes con co-expresión de intensidad alta de pS6 y p4E-BP1, que en ausencia de expresión de BAP1 tienen mayor índice de mitosis/10 CGA frente a los que expresan BAP1. Lo que nos indica esta asociación es justamente lo contrario de la anterior, ya que para aquellos tumores con activación de la síntesis de proteínas y del ciclo celular serían los BAP1 mutados los que proliferarían más. Estaría por determinar, si hubiera algún subtipo histológico que predominara en los tumores incluidos entre los casos que establecen estas relaciones y ello pudiese tener alguna relevancia, dada la asociación que establece Koopmans entre la expresión IHQ negativa de BAP1 y la histología epitelioide (121), de cara a posibles asociaciones pronósticas en nuestra serie, en ausencia de poder

realizar un PEG a los tumores de la misma para comprobar el estado mutacional del gen en cuestión y determinar el valor de la técnica de IHQ en los tumores de nuestra muestra. La falta de datos estadísticamente relevantes no nos permiten profundizar en el valor de dichas relaciones.

De los resultados obtenidos del análisis de las variables estudiadas en este trabajo se deriva que la vía de mTOR parece tener una especial importancia en el MU. Hemos querido caracterizarlo/comprobarlo en modelos in vitro en el que se han empleado tres líneas celulares distintas: UW1 formada por melanocitos uveales de morfología dendrítica, que se ha utilizado como “control”, OCM1 formada por células fusiformes de melanoma uveal *BRAF* mutado (V600E) con poca capacidad invasiva y MKTBR formada por células fusiformes de melanoma uveal, no bien caracterizada a nivel genético (178, 179, 180). Con los inhibidores (DTIC, PP242 y AZD8330) utilizados en monoterapia no hemos observado grandes diferencias, en la respuesta inhibitoria a los fármacos, en ninguna de las tres líneas celulares. Sí que hemos objetivado diferentes respuestas inhibitorias en terapia combinada con los diferentes fármacos, de modo que para las células de OCM1 la combinación de los tres fármacos fue la única en alcanzar efecto sinérgico y en cambio para las de MKTBR la combinación de fármacos en pauta dual o los tres fármacos juntos (con excepción de IC50) tuvo un efecto sinérgico con una mayor respuesta inhibitoria para mTORi. Las diferentes respuestas observadas para cada línea celular, podría ser debida a la presencia de mutaciones selectivas, por tanto la eficacia de los tratamientos combinados con inhibidores de mTOR y MAPK estaría determinada por el genotipo celular/tumoral según comprobó Ho en su trabajo (177). Según esta idea, para la línea de OCM1, portadora de una mutación de *BRAF*, esperábamos haber observado mayor inhibición con MAPKi y en este sentido es posible que hayan intervenido mecanismos de resistencia a los fármacos. No podemos caracterizar bien la respuesta de la línea MKTBR a los inhibidores ya que no está bien establecido el genotipo tumoral en ella.

Los modelos in vitro nos han permitido concluir que la respuesta a los fármacos empleados, aun pudiendo ser dependiente al estado mutacional de las células utilizadas, muestran como los efectos combinados de inhibición de rutas de señalización con quimioterapia resultan en un efecto sinérgico en cuanto a la

disminución de la viabilidad celular de las mismas, abriendo con ello una nueva vía de estudio en el empleo de dichas combinaciones. Aunque las líneas que hemos empleado para realizar nuestros ensayos no hayan resultado las más representativas del estado mutacional genético que se ha descrito para el MU, pensamos que los resultados obtenidos deberían confirmarse en más modelos in vitro así como en modelos in vivo para poder validar estos resultados tan prometedores.

No podemos obviar las limitaciones de este trabajo, las cuales han influido en los resultados del mismo. En primer lugar, la realización y la valoración IHQ de los marcadores del “signaling” ha resultado más compleja, debido al revelado en rojo de la técnica, tanto a nivel de procesado como de interpretación. En segundo lugar, esta serie presenta un sesgo en relación al seguimiento clínico de los pacientes incluidos de hasta el 50% de los casos, donde dicha información no se ha podido recoger. Finalmente, un propósito de este trabajo era el de poder utilizar los resultados en la práctica asistencial diaria estableciendo puntos de corte de aplicación objetiva y reproducible entre observadores. Todas estas limitaciones han condicionado los resultados obtenidos que garantizan su continuidad en futuros trabajos de investigación.

IX. CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

1. La serie estudiada de 101 casos de melanomas uveales corrobora los criterios pronósticos clínico-patológicos descritos previamente:
 1. Los factores predictivos de peor pronóstico son: (a) edad (>48 años), (b) mitosis (2-4/10CGA), (c) histología epitelioides, (d) infiltrado inflamatorio linfocitario (intenso), (e) estadio III al diagnóstico y (f) la localización no coroidea del tumor.
2. El tamaño tumoral en nuestra serie es un factor pronóstico independiente. Los pacientes que presentan un mayor tamaño tumoral (expresado en volumen >100mm³) poseen un mayor riesgo de desarrollar metástasis ($p < 0,001$), mientras que los pacientes que presentan un tamaño tumoral >150mm³ presentan un mayor riesgo de éxitus por enfermedad ($p = 0,002$) y una menor supervivencia global ($p < 0,001$).
3. En relación al valor pronóstico de los diferentes marcadores implicados en las rutas de señalización de MAPK y PI3K-AKT-mTOR analizados:
 1. Los pacientes que presentan bajos niveles de expresión del receptor HER3 poseen más del doble de riesgo de desarrollar metástasis durante el seguimiento ($p = 0,035$) (HR= 2,662).
 2. Los niveles de expresión de pMAPK, pS6 y de 4E-BP1 se asocian de manera inversa al tamaño tumoral (expresado en volumen), de forma estadísticamente significativa.
 3. Los valores de expresión de 4E-BP1 se asocian a la *histología* de forma estadísticamente significativa ($p = 0,025$). En los pacientes con niveles de expresión baja de 4E-BP1 el 84,6% de los tumores son de histología epitelioides y en los pacientes con expresión alta de 4E-BP1 son epitelioides el 30,5% de los tumores.

4. Los pacientes que presentan bajos niveles de expresión de p4E-BP1 presentan una mayor supervivencia global, en el subgrupo de pacientes con metástasis hepática.
 5. Los marcadores del ciclo celular, P16 y Ki67 tienen valor pronóstico. Los pacientes que muestran moderados o bajos niveles de expresión de P16 presentan mayor riesgo de muerte por enfermedad ($p=0,032$) y menor supervivencia global ($p=0,030$), mientras que aquellos pacientes que presentan valores de Ki67 >22 núcleos positivos/CGA presentan mayor riesgo de muerte por enfermedad ($p=0,012$) y menor supervivencia global ($p=0,070$). El uso combinado de dichos marcadores (P16 y Ki67) puede predecir el tiempo de supervivencia libre de enfermedad. (Valor predictivo positivo=77,8% y valor predictivo negativo=74,2%).
4. De los análisis realizados en distintos modelos *in vitro* se concluye que:
1. El uso de inhibidores específicos de las rutas de MAPK (AZD0330) y PI3K/AKT/mTOR (PP242) han mostrado tener un efecto sinérgico en la disminución de la viabilidad celular de los diferentes modelos *in vitro* analizados (UW1, MKTBR y OCM1). Dicho efecto se ha observado al combinarlos junto al quimioterápico Dacarbacina.

X. REFERENCIAS

X. REFERENCIAS

1. Ramon L. Font, MD; J. Oscar Croxatto, MD; Narsing A. Rao, MD. AFIP ATLAS OF TUMOR PATHOLOGY Fourth series, Fascicle 5. Tumors of the Eye and Ocular Adnexa. American Registry of Pathology & Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC. 2006.
2. María Matilla Rodero. Tesis Doctoral. Caracterización patobiológica del melanoma uveal. Universidad de Málaga, Facultad de Medicina, Departamento de Histología y Anatomía Patológica, 2003. ISBN: 8468872121.
3. Nora V. Laver, MD; Margaret E. McLaughlin, MD; Jay S. Duker, MD . Ocular Melanoma. (Arch Pathol Lab Med. 2010;134:1778–1784).
4. Dominic M. Buzzacco,¹ Mohamed H. Abdel-Rahman,^{1,2} Stanley Park¹, Frederick Davidorf, Thomas Olencki and Colleen M. Cebulla. Long-Term Survivors with Metastatic Uveal Melanoma. The Open Ophthalmology Journal, 2012, 6, 49-53
5. Pratima Kathil, Tatyana Milman, Paul T. Finger. Characteristics of Anterior Uveal Melanocytomas in 17 Cases. Ophthalmology 2011;118:1874-1880.
6. Gianni Virgili, Gemma Gatta, Laura Ciccolallo, Riccardo Capocaccia, Annibale Biggeri, Emanuele Crocetti, Jean-Michel Lutz, Eugenio Paci, EURO CARE Working Group. Incidence of Uveal Melanoma in Europe. Ophthalmology 2007;114:2039-2315.
7. Arun D. Singh, Mary E. Turell, Allan K Topham. Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival. Ophthalmology 2011;118:1881-1885
8. Arun D. Singh, Allan Topham. Survival Rates with Uveal Melanoma in the United States: 1973-1997. Ophthalmology 2003;110:962-965.
9. Arun D. Singh, Allan Topham. Incidence of Uveal Melanoma in the United States: 1973-1997. Ophthalmology 2003;110:956-961.
10. Scott E. Woodman. Metastatic Uveal Melanoma: Biology and Emerging Treatments. Cancer J. 2012;18(2):148-152.
11. Evita Henderson, MD; Cutris E. Margo, MD, MPH. Iris Melanoma. Arch Pathol Lab Med. 2008; 132:268-272.

12. Mariana Costache, Oana Patrascu, Dumitru Adrian, Diana Costache, Maria Sajin, Emil Ungureanu, Olga Simionescu. Ciliary Body Melanoma - A Particularly Rare Type of Ocular Tumor. Case Report and General considerations. *A Journal of Clinical Medicine* 2013; 8(4): 360-364.
13. Sachin M. Salvi, Arun D. Singh. Diagnostic and Management Challenges of Ciliary Body Tumor in African-American Patient. *Ocul Oncol Pathol* 2016;2:16-19.
14. Elyse S. Blum, Jessica Yang, Kimberly M. Komatsubara and Richard D. Carvajal. Clinical Management of Uveal and Conjunctival Melanoma. *Oncology* January 15, 2016
15. Berry M, Lucas LJ. Circumscribed choroidal hemangioma: A case report and literature review. *J Optom* 2016 Feb 10.
16. Shields JA, Demirchi H, Mashayekhi A, Eagle RC Jr, Shields CL. Melanocytoma of the optic disk: a review. *Surv Ophthalmol.* 2006 Mar-Apr;51(2):93-104.
17. Loose IA, Jampol LM, O'Grady R. Pigmented adenoma mimicking a juxtapapillary melanoma. A 20-year follow-up. *Arch Ophthalmol* 1999 Jan;117(1): 120-2.
18. Folberg R, Pe'er J, Gruman LM, et al. The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary uveal melanoma: a matched case-control study. *Human Pathology* 1992;23:1298-305.
19. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Histopathologic Characteristics of Uveal Melanomas in Eyes Enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study COMS Report No. 6. *American Journal of Ophthalmology* 1998 June; 125(6):745-66.
20. Shields CL, Manalac J, Das C, Ferguson K, Shields JA. Choroidal melanoma: clinical features, classification and top 10 pseudomelanomas. *Curr Opin Ophthalmol.* 2014 May;25(3):177-85.
21. E. Weis, T.G. Salopek, J.G. McKinnon, M.P. Larocque, C. Temple-Oberle, T. Cheng, J. McWhae, R. Sloboda and M. Shea-Budgell. Management of uveal melanoma: a consensus-based provincial clinical practice guideline. *Curr Oncol.* 2016 Feb;23 (1):e57-e64.
22. Hans E. Grossniklaus, Daniel M. Albert, W. Richard Green, Brian P. Conway, Kenneth R. Hovland. Clear Cell Differentiation in Choroidal Melanoma. COMS Report No. 8. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(7):894-898.

23. Mourad K. Khalil. Balloon cell malignant melanoma of the choroid: ultrastructural studies. *British Journal of Ophthalmology*. 1983, 67, 579-584.
24. Riley FC: Balloon cell melanoma of the choroid. *Arch Ophthalmol* 1974;92:131–133.
25. Messmer EM, Hoops JP, Stefani FH: Signet ring malignant melanoma of the choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(suppl):244.
26. Verdijk RM, Koopmans AE, Kilic E, Paridaens D, de Klein A: Histopathologic, immunohistochemical, and cytogenetic analysis of primary clear cell melanoma of the uvea. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:814–816.
27. Verdijk RM, van den Bosch T, Naus NC, Paridaens D, Mooy CM, de Klein A: Histopathologic, immunohistochemical, ultrastructural, and cytogenetic analysis of oncocytic uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2011;129:1501–1502.
28. Pelayes DE, Velazquez-Martin JP, Simpson RE, Zarate JO: Primary choroidal melanoma with divergent neuroendocrine differentiation. *J Ophthalmic Pathol* 2013;2:4.
29. Serdar Yavuziyigitoglu, Emine Kilic, Jolanda Vaarwater, Annelies de Klein, Dion Paridaens, Robert M. Verdijk. Lipomatous Change in Uveal Melanoma: Histopathological, Immunohistochemical and Cytogenetic Analysis. *Ocul Oncol Pathol* 2016;2:133-135
30. Miguel N. Burnier Jr, Ian W. Mc Lean, John W. Gamel. Immunohistochemical Evaluation of Uveal Melanocytic Tumors. Expression of HMB-45, S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase. *Cancer* 68:809-814,1991.
31. Bruno F Fernandes, Alexandre N Odashiro, Vinicius S Saraiava, Patrick Logan, Emilia Anteck, Miguel N Burnier Jr. Immunohistochemical expression of melan-A and tyrosinase in uveal melanoma. *Journal of Carcinogenesis* 2007, 6:6. doi: 10.1186/1477-3163-6-6
32. FCS. Ramaekers, JJG. Puts, O. Moesker, A. Kant, GP. Vooijis. Intermediate Filaments in Malignant Melanomas. Identification and Use as Marker in Surgical Pathology. *J. Clin Invest.* Vol 71. March 1983;635-643.
33. Ulrich Fuchs, Tero Kivelä, Paula Summanen, Ilkka Immonen, Ahti Tarkkanen. An Immunohistochemical and Prognostic Analysis of Cytokeratin Expression in Malignant Uveal Melanoma. *American Journal of Pathology* 1992;141:169-181.

34. Satori Iwamoto, Robert C. Burrows, Robert E. Kalina, David George, Michael Boehm, Mark A. Bothwell, Rodney Schmidt. Immunophenotypic Differences Between Uveal and Cutaneous Melanomas. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:466-470.
35. Callender, GR. Malignant melanocytic tumors of the eye. A study of histologic types in 111 cases. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol*. 36: 131, 1931
36. Callender, GR., Wilder, HD., Ash, JE. Five hundred melanomas of the choroid and ciliary body followed five years or longer. *Am J. Ophthalmol*, 25:962, 1942.
37. Paul, EV., Parnell, BL., Fraker, M. Prognosis of malignant melanomas of the choroid and ciliary body. *Int. Ophthalmol. Clin*. 2:387, 1962.
38. Mc Lean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Gamel JW. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* 1983;96:502-509
39. AJCC Cancer Staging Manual. 7th edition 2010. Springer. (páginas:547-559).
40. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer Classification of Uveal Melanoma (Anatomic Stage) Predicts Prognosis in 7731 Patients. The 2013 Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 2015;122:1180-1186.
41. AJCC Ophthalmic Task Force. International validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol*. 2015 Apr;133(4):376-383. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.5395.
42. Shields JA, Shields CL. Management of posterior uveal melanoma: past, present, and future. The 2014 Charles L. Schepens Lecture. *Ophthalmology* 2015;122:414-428.
43. The American Brachytherapy Society-Ophthalmic Oncology Task Force. The American Brachytherapy Society consensus guidelines for plaque brachytherapy of uveal melanoma and retinoblastoma. *Brachytherapy* 13 (2014) 1-14.
44. Shields CL, Furuta M, Thangappan A, et al. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch Ophthalmol* 2009;127:989-998.
45. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer Classification of Posterior Uveal Melanoma (Tumor size Category) Predicts Prognosis in 7731 Patients. *Ophthalmology* 2013;120:2066-2071.

46. Swathi Kaliki, Carol L Shields, Jerry A Shields. Uveal melanoma: Estimating prognosis. *Indian J Ophthalmol*. 2015 Feb; 63(2): 93–102. PMID: PMC4399142 doi:10.4103/0301-4738.154367
47. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi A, Shields JA. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina*. 2012;32:1363–72. [PubMed: 22466491]
48. Zloto O, Pe'er J, Frenkel S. Gender differences in clinical presentation and prognosis of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:652–6. [PubMed: 23197684]
49. Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, Patel A, Abramson DH, Chapman PB. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:8076–80. [PubMed: 16258106]
50. Holly EA, Aston DA, Ahn DK, Kristiansen JJ, Char DH. Uveal melanoma, hormonal and reproductive factors in women. *Cancer Res*. 1991;51:1370–2. [PubMed: 1997174]
51. Li W, Gragoudas ES, Egan KM. Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:1066–70. [PubMed: 10922199]
52. Demirci H, Shields CL, Shields JA, Eagle RC, Jr, Honavar SG. Diffuse iris melanoma: A report of 25 cases. *Ophthalmology*. 2002;109:1553–60. [PubMed: 12153810]
53. 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. [PubMed: 12476094]
54. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Shields JA. Diffuse versus nondiffuse small (=3 MM thickness) choroidal melanoma: Comparative analysis in 1,751 cases. The 2012 F. Phinzy Calhoun lecture. *Retina*. 2013;33:1763–76. [PubMed: 23584696]
55. Shields CL, Kaliki S, Livesey M, Walker B, Garoon R, Bucci M, Feinstein E, Pesch A, Gonzalez C, Lally SE, Mashayekhi A, Shields JA. Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: analysis of 7872 consecutive eyes. *JAMA Ophthalmol*. 2013 Aug;131(8): 993-1003. doi: 10.1001/jammaophthalmol.2013.129.

56. European Ophthalmic Oncology Group. The Pediatric Choroidal and Ciliary Body Melanoma Study. *Ophthalmology* 2016;123:898-907.
57. Mc Lean MJ, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol.* 1977 jan;95 (1):48-58
58. Lattman J, Kroll S, Char DH, Ghazvini S, Frigillana H, O'Brien JM, Elbakri H. cell Cycling and Prognosis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res* 1995;1: 41-47
59. Angi M. Damato B, Kalirai, Dodson A, Taktak A, Coupland SE. Immunohistochemical assessment of mitotic count in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol.* 2011;89: e155-e160. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01769.x
60. Pe'er J, Gnessin H, Shargal Y, Livni N. PC-10 immunostaining of proliferating cell nuclear antigen in posterior uveal melanoma. Enucleation versus enucleation postirradiation groups. *Ophthalmology.* 1994 Jan;101(1):56-62.
61. Mooy CM, Luyten GP, de Jong PT, Luider TM, Stijnen T, van de Ham F, van Vroonhoven CC, Bosman FT. Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* 1995, 147:1097-1104.
62. Chiquet C, Grange JD, Ayzac L, Chauvel P, Patricot LM, Devouassoux-Shisheboran. 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.
63. Lane AM, Egan KM, Yang J, Saornil MA, Alroy J, Albert D, Gragoudas ES. An evaluation of tumor vascularity as prognostic indicator in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 1997 Jun;7(3):237-42.
64. Rummelt V, Folberg r, Rummelt C, Gruman LM, Hwang T, Woolson RF et al. Microcirculation architecture of melanocytic nevi and malignant melanomas of the ciliary body and choroid: a comparative histopathologic and ultrastructural study. *Ophthalmology* 1994; 101:718-27.
65. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T. Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:359-67.
66. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T. Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2471-80.

67. Coleman DJ, Rondeau MJ, Silverman RH, Folberg R, Rummelt V, Woods SM, et al. Correlation of microcirculation architecture with ultrasound backscatter parameters of uveal melanoma. *Eur J Ophthalmol* 1995;5:96-106
68. Muller AJ, Bartsch DU, Folberg R, Mehaffey MG, Boldt HC, Meyer M, et al. Imaging de microvasculature of choroidal melanomas with confocal indocyanine green scanning laser ophthalmoscopy. *Arch Ophthalmol* 1998;116:31-9.
69. Cicaloni B, Paterra N. The properties of intratumoral blood flow as a possible prognostic index in uveal melanoma: a study using color Doppler imaging. *Ann Ophthalmol* 1997;29:225-30.
70. Mc Lean IW, Keefe KS, Burnier 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.
71. Pe'er J, Rummelt V, Mawn L, Hwang T, Woolson RF, Folberg R. Mean of the ten largest nucleoli, microcirculation architecture, and prognosis of ciliochoroidal melanomas. *Ophthalmology*. 1994 Jul;101(7):1227-35.
72. Gamel JW, Mc Lean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanomas: correlation of cytologic features with prognosis. *Cancer* 1978;41:1897-901.
73. Al-Jamal RT, Mäkitie T, Kivelä T. Nucleolar diameter and microvascular factors as independent predictors of mortality from malignant melanoma of the choroid and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Jun;44(6):2381-9.
74. Al-Jamal RT, Kivelä T. KI-67 immunopositivity in choroidal and ciliary body melanoma with respect to nucleolar diameter and other prognostic factors. *Curr Eye Res* 2006 Jan;31(1):57-67
75. Coleman K, Baak JPA, Van Diest PJ, Mullaney J. Prognostic value of morphometric features and the Callender classification in uveal melanomas. *Ophthalmology* 1996;103:1634-1641
76. Al-Jamal RT, Toivonen P, Kivelä T. Nucleolar size in choroidal and ciliary body melanomas and corresponding hepatic metastases. *Acta Ophthalmol* 2010;88:458-62. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01556.x
77. De la Cruz PO, Jr, Specht CS, Mc Lean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;65:112-5

78. Whelchel JC, Farah SE, Mc Lean IW, Burnier MN. Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Visc Sci.* 1993;34:2603-6.
79. Durie FH, Campbell AM, Lee WR, Damato BE. Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:2106-2110.
80. Bronkhorst IH, Jager MJ. Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun* 2012;4:454-462. doi: 10.1159/000334576
81. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68+ cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1414-1421
82. Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, Jager Mj. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:643-650. doi: 10.1167/iovs.10-5979
83. Jager MJ, Ly LV, El Filali M, Madigan MC. Macrophages in uveal melanoma and in experimental ocular tumor models: friends or foes?. *Progress in Retinal and Eye Research* 30 (2011) 129-146. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.004
84. Bronkhorst IH, Vu THK, Jordanova ES, Luyten GP, van der Burg SH, Jager Mj. Different subsets of tumor-infiltrating lymphocytes correlate with macrophage influx and monosomy 3 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:5370-5378. doi: 10.1167/iovs.11-9280
85. Herwig MC, Grossniklaus HE. Role of macrophages in uveal melanoma. *Expert Rev Ophthalmol.* 2011 August;6(4):405-407. doi:10.1586/eop.11.45.
86. Ly LV, Bronkhorst IH, van Beelen E, Vrolijk J, Taylor AW, Versluis M, Luyten GPM, Jager MJ. Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration
87. Seeton 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 Dec;101(12):1894-9
88. García-Álvarez C, Saornil MA, López-Lara F, Almaraz A, Muñoz MF, Frutos-Baraja J, Muiños I. Episcleral Brachytherapy for uveal melanoma: analysis of 136 cases. *Clin Transl Oncol.* 2012 May;14(5):350-5. doi: 10.1007/s12094-012-0807-1.

89. Pyrhönen S. The treatment of metastatic uveal melanoma. *Eur J Cancer*. 1998 Jul;34 Suppl 3: s27-30
90. Triozzi PL, Singh AD. Adjuvant therapy of uveal melanoma: current status. *Ocul Oncol Pathol* 2015;1:54-62. doi: 10.1159/000367715
91. Pyrhönen S, Hahka-Kemppinen M, Muhonen T, Nikkanen V, Eskelin S, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Chemoimmunotherapy with bleomycin, vincristine, lomustine, dacarbazine (BOLD), and human leukocyte interferon for metastatic uveal melanoma. *Cancer* 2002;95:2366-72. doi: 10.1002/cncr.10996
92. Bedikian AY, Legha SS, Mavligit G, Carrasco CH, Khorana S, Plager C, Papadopoulos N, Benjamin RS. Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver. A review of the M.D. Anderson Cancer Center experience and prognostic factors. *Cancer* 1995;76:1665-70
93. Buder K, Gesierich A, Gelbrich G, Goebeler M. Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: review of literature and future perspectives. *Cancer Medicine* 2013;2(5):674-686.
94. Carvajal RD, Sosman JA, Quevedo JF, et al. Effect of Selumetinib vs Chemotherapy on Progression-Free Survival in Uveal Melanoma. *JAMA*. 2014;311(23):2397. doi:10.1001/jama.2014.6096
95. Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, Craig EL, Davidorf FH, Eng C. High Frequency of Submicroscopic Hemizygous Deletion Is a Major Mechanism of Loss of Expression of PTEN in Uveal Melanoma. *J Clin Oncol*. 2005;24(2): 288-295. doi:10.1200/JCO.2005.02.2418.
96. Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, et al. The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K Signaling Pathways in Human Uveal Melanoma Cells: Interaction with B-Raf/ERK. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2010;51(1):421. doi:10.1167/iovs.09-3974.
97. Kath R, Hayungs J, Bornfeld N, Sauerwein W, Höffken K, Seeber S. Prognosis and treatment of disseminated uveal melanoma. *Cancer* 1993;72:2219-2223.
98. Luyten GPM, Mooy CM, Post J, Jensen OA, Luider OA, de Jong PTMV. Metastatic uveal melanoma. A morphologic and immunohistochemical analysis. *Cancer* 1996;78:1967-71.
99. Demicheli R, Fornili M, Biganzoli E. Bimodal mortality dynamics for uveal melanoma: a cue for metastasis development traits?. *BMC Cancer* 2014, 14:392. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/392>.

100. Kaliki S, Shields CL, Shields JA. Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian J Ophthalmol*. 2015 Feb;63(2):93-102. doi:10.4103/0301-4738.154367
101. Schoenfield L, Pettay J, Tubbs RR, Singh AD. Variation of monosomy 3 status within uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:1219-22.
102. Young TA, Burgess BL, Rao NP, Gorin MB, Straatsma R. High-density genome array is superior to fluorescence in-situ hybridization analysis of monosomy 3 in choroidal melanoma fine needle aspiration biopsy. *Molecular Vision* 2007;13:2328-33.
103. Shields CL, Materin MA, Teixeira L, Mashayekhi A, Ganguly A, Shields JA. Small choroidal melanoma with chromosome 3 monosomy on fine-needle aspiration biopsy. *Ophthalmology* 2007;114(10):1919-1924. doi: 10.1016/j.ophtha.2007.04.054
104. Magauran RG, Gray B, Small KW. Chromosome 9 abnormality in choroidal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1994;117:109-11.
105. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jockel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-5.
106. Kilic E, Naus NC, van Gils W, Klaver CC, van Til ME, Verbiest MM et al. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased sidease-free survival in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2253-7.
107. Scholes AGM, Damato BE, Nunn J, Hiscott P, Grierson I, Field JK. Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1008-1011). doi: 10.1167/iovs.02-0159.
108. Kilic E, van Gils W, Lodder E, Beverloo HB, van Til ME, Mooy CM, Paridaens D, de Klein A, Luyten GPM. Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:3703-3707.
109. White VA, Chambers JD, Courtright PD, Chang Wy, Horsman DE. Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer* 1998;83:354-9
110. Aalto Y, Eriksson L, Seregard S, Larsson O, Knuutila S. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in

- metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:313-17
111. Loercher AE, Harbour JW. Molecular genetics of uveal melanoma. *Current eye research* 2003;27;(2):69-74.
 112. Sellam A, Desjardins L, Barnhill R, Plancher C, Asselain B, Savignoni A, Pierron G, Cassoux N. Fine needle aspiration biopsy in uveal melanoma: technique, complications and outcomes. *Am J Ophthalmol* 2016;163:28-34.
 113. Naus NC, Verhoeven ACA, van Drunen E, Slater R, Mooy CM, Paridaens DA, Luyten GPM, de Klein A. Detection of genetic prognostic markers in uveal melanoma biopsies using fluorescence in situ hybridization. *Clinical Cancer Research* 2002;8:534-539.
 114. Tschentscher F, Hüsing J, Hölter T, Kruse E, Dresen IG, Jöckel KH, Anastassiou G, Schilling H, Bornfeld N, Horsthemke B, Lohmann DR, Zeschnigk M. Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Research* 2003; 63:2578-2584.
 115. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Research* 2004;64:7205-7209.
 116. Gill HS, Char DH. Uveal melanoma prognostication: from lesion size and cell type to molecular class. *Can J Ophthalmol* 2012;47:246-253.
 117. Harbour JW. The genetics of uveal melanoma: an emerging framework for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012 March;25(2):171-181. doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.00979.x.
 118. Onken MD, Worley LA, Char DH y col. Collaborative Oncology Group Report No.1: Prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology.* 2012 August;119(8):1596-1603. doi:10.1016/j.ophta.2012.02.017.
 119. Harbour JW, Onken MD, Roberson EDO, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matatall KA, Helms C, Bowcock AM. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 2010 December 3;330:1410-1413. doi: 10.1126/science.1194472
 120. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB, Christopher BN, Boru G, Hovland P, Davidorf FH. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal

- melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J Med Genet* 2011;48:856-859. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100156.
121. Koopmans AE et al. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Modern Pathology* (2014) 27, 1321-1330. doi: 10.1038/modpathol.2014.43
122. Field MG, Harbour JW. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014 May;25(3):234-239.
123. Landerville S, Agapova OA, Harbour WJ. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future Oncol*. 2008 October;4(5):629-636. doi: 10.2271/14796694.4.5.629.
124. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, Chowers I, Merbs SL, Pe'er J, Sidransky D. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2876-2878. doi: 10.1167/iovs.02-1329
125. Malaponte G, Libra M, Gangemi P, Bevelacqua V, Mangano K, D'Amico F y col. Detection of BRAF gene mutation in primary choroidal melanoma tissue. *Cancer Biol Ther* 2006;5(2):225-227.
126. Edmunds SC, Cree IA, D'Ángelantonio F, Hungerford JL, Hurren JS, Kelsell DP. Absence of BRAF gene mutations in uveal melanomas in contrast to cutaneous melanomas. *British Journal of Cancer* (2003) 88, 1403-1405. doi: 10.1038/sj.bjc.6600919
127. Cruz C, Teule A, Caminal JM, Blanco I, Piulats JM. Uveal melanoma and BRCA1/BRCA2 genes: a relationship that needs further investigation. *Journal of Clinical Oncology* 2011, 29;(34): e827-e829. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8828
128. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular Pathology of uveal melanoma. *Eye* (2013) 27, 230-242. doi: 10.1038/eye.2012.255
129. Helgadóttir H, Höiom V. The genetics of uveal melanoma: current insights. *The Application of Clinical Genetics* 2016;9:147-155
130. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1): 57-70
131. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-674
132. Zuidervaart W. van Nieuwpoort F, Stark M, Dijkman R, Packer L, Borgstein, Pavey S, van der Velden P, Out C, Hayward NK and Gruis NA. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanoma although it rarely occurs

- through mutation of BRAF or RAS. *British Journal of Cancer* (2005) 92, 2032-2038. doi: 10.1038/sj.bjc.6602598
133. O'Reilly KE, Warycha M, Davies MA, Rodrik V, Zhou XK, Yee H, Polsky D, Pavlick AC, Rosen N, Bhardwaj N, Mills G, Osman I. Phosphorylated 4E-BP1 is associated with poor survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(8): 2872-2878.
134. Shi Y, Hsu J, Hu L, Gera J, Lichtenstein A. Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, Vol 277, No.18, Issue of May 3, pp. 15712-15720. doi: 10.1074/jbc.M200043200
135. Saraiva VS, Caissie AL, Segal L, Edelstein C, Burnier MN Jr. Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. *Melanoma research*. 2005; 15:245–50.
136. Musi E, Ambrosini G, de Stanchina E, Schwartz GK. The Phosphoinositide 3-Kinase Selective Inhibitor, BYL719, Enhances the Effect of the Protein Kinase C Inhibitor, AEB071, in GNAQ/GNA11 Mutant Uveal Melanoma Cells. *Mol Cancer Ther*. 2014 May ; 13(5): 1044–1053. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0550.
137. Pópulo H, Soares P, Rocha AS, Silva P, Lopes JM. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Reserch* 2010, 20:107-117. doi: 10.1097/CMR.0b013e32832ccd09
138. van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, Hurks H, Frants R, Gruis NA, Jager MJ. Promoter Hypermethylation: a common cause of reduced p16INK4a expression in uveal melanoma. *Cancer Reserch* 61, 5303-5306, July 1, 2001
139. Liggett WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1998 March;16(3):1197-1206
140. Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. *EBioMedicine* 8 (2016) 30–39
141. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (2011) 1619-1633. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.012

142. Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of the MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1802(4):396-405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009
143. Trocmé E, Mougiakakos D, Johansson CC, All-Eriksson C, Economou MA, Larsson O, Seregard S, Kiessling R, Lin Y. Nuclear Her3 is associated with favorable overall survival in uveal melanoma. *Int. J. Cancer*:130,1120-1127 (2012)
144. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2007;7:295-308
145. Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-kinase/AKT/mTOR signaling pathway. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013 October; 22(4):.doi:10.1016/j.soc.2013.06.008
146. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006 August; vol 7:606-619
147. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology. Molecular and Cellular Oncology*. 2014 April;Vol 4:article 64. doi:10.3389/fonc.2014.00064
148. McCubrey JA, Steelman LS, Chapell WH & col. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* 2012;3:954-987
149. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, McCubrey JA. The emerging role of the phosphatidylinocitol 3-kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin signaling network in cancer stem cell biology. *Cancers* 2010,2, 1576-1596. doi: 10.3390/cancers2031576
150. Meyuhas O, Dreazen A. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009;90:109-153. doi: 10.1016/S1877-1173(09)90003-5.
151. Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*. 2006 Jun;31(6):342-348. doi: 10.1016/j.tibs.2006.04.003
152. Shveygert M, Kaiser C, Bradrick SS, Gromeier M. Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E) phosphorylation by Mitogen-Activated protein kinase

- occurs through modulation of Mnk1-eIF4G interaction. *Molecular and Cellular Biology*. Nov.2010;13(21):5160-5167. doi: 10.1128/MCB.00448-10.
153. Martineau Y, Azar R, Bousquet C, Pyronnet S. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* (2013) 32, 671-677. doi:10.1038/onc.2012.116
154. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* (2004) 23, 3189-3199. doi: 10.1038/sj.onc.1207545.
155. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jiménez J, Guzman M, Sabadell MD, Baselga J, Ramón y Cajal S. 4E-Binding Protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* 2007;13(1): 81-89.
156. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, Ramón y Cajal S. Phosphorylated 4E Binding Protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer* 2006;107:1801-1811
157. Armengol G, Rojo F, Castellví J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, Baselga J, Ramon y Cajal S. 4E-Binding Protein 1: a key molecular “funnel factor” in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 2007;67(16):7551-5.
158. Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621-681. doi:10.1124/pr.58.3.10
159. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-446. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
160. Antonia Saornil. “Tècniques diagnòstiques en els tumors intraoculars. Factors pronòstics”. *42 Congrés de la Societat Catalana d’Oftalmologia. Cirurgia refractiva, Uveïtis, Oncologia Ocular*. Barcelona 24, 25 i 26 de novembre de 2011.
161. Fernandes BF, Belfort RN, Di Cesare S, Burnier MN Jr. Circulating uveal melanoma cells: should we test for them? *Can J Ophthalmol*. 2008 Apr;43(2): 155-8. doi: 10.3129/i08-011
162. Mc Lean IW. The biology of haematogenous metastasis in human uveal malignant melanoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;422:433-7.

163. García-Arumí J, Sararols L, Martínez V, Corcostegui B. Vitreoretinal surgery and endoresection in high posterior choroidal melanomas. *Retina*. 2001;21(5): 445-452.
164. García-Arumí J, Zapata MA, Balaguer O, Fonollosa A, Boixadera A, Martínez-Castillo V. Endoresection in high posterior choroidal melanomas: long-term outcome. *Br J Ophthalmol*. 2008 Aug;92(8):140-45. doi:10.1136/bjo.2008.137562.
165. García-Arumí J, Leila M, Zapata MA, Velázquez D, Dinares-Fernandez MC, Tresserra F, Corcostegui B. Endoresection technique with/without brachytherapy for management of high posterior choroidal melanoma: extended follow-up results. *Retina*. 2015 Apr;35(4):628-37. doi: 10.1097/IAE.0000000000000379.
166. Di Cesare S, Nantel A, Marshall JC, Fernandes BF, Antecká E, Orellana ME, Abourbih D, Saornil AM, Burnier MN, Jr. Expression profiling of formalin-fixed paraffin embedded primary human uveal melanomas using DASL matrices. *J Cancer Res Clon Oncol* 2010;136:577-86.
167. Cristina Teixidó Febrero. Tesis Doctoral. Study of the tumor sensitivity of the marine antitumoral compound elisidepsin and HER3 receptor in breast carcinomas. Universitat Autònoma de Barcelona, Faculty of Biosciences, Department of Genetics and Microbiology, 2012.
168. Yen L, Cao Z, Wu X, Ingalla E, Baron C, Young L, Gregg J, Cardiff R, Borowsky A, Sweeney C, and Carraway III K. Loss of Nrdp1 Enhances ErbB2/ErbB3-Dependent Breast Tumor Cell Growth. *Cancer Res* 2006; 66(23): 11279-86.
169. Bijay S Jaiswal et al. Oncogenic ERBB3 Mutations in human Cancers. *Cancer Cell*. 2013 May 13;23(5):603-17. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.012
170. Mujoo K, Choi BK, Huang Z, Zhang N, An Z. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. *Oncotarget*, Vol.5, No 21, 10222-10237
171. Huang J, El-Gamil M, Dudley ME, Li YF, Rosenberg SA, Robbins PF. T Cells Associated with Tumor Regression Recognize Frameshifted Products of the CDKN2A Tumor Suppressor Gene Locus and a Mutated HLA Class I Gene Product. *J Immunol*. 2004 May 15; 172(10): 6057-6064.
172. Ribas A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov*. 2015 Sep;5(9):915-9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0563.

173. Kennedy SP, Hastings JF, Han JZR, Croucher DR. The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. August 2016. Vol 4. Article 88. doi: 10.3389/fcell.2016.00088
174. Sartor CI, Zhou H, Kozłowska E, Guttridge K, Kawata E, Caskey L, Harrelson J, Hynes N, Ethier S, Calvo B, Earp HS. HER4 Mediates Ligand-Dependent Antiproliferative and Differentiation Responses in Human Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, July 2001. Vol. 21, No. 13. p. 4265–4275 doi: 10.1128/MCB.21.13.4265–4275.2001
175. Zhenhe Suo, Bjørn Risberg, Mats G. Kallsson, Kenneth Willman, Anne Tierens, Eva Skovlund, Jahn M. Nesland. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J. Pathol* 2002;196:17-25. doi:10.1002/path.1003
176. Yang W, Chen PW, Li H, Alizadeh H, Niederkorn JY. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of the T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(6):2518-2525.
177. Ho AL, Musi E, Ambrosini G, Nair JS, Deraje Vasudeva S, de Stanchina E, Schwartz GK. Impact of combined mTOR and MEK inhibition in uveal melanoma is driven by tumor genotype. *PLoS One*. 2012;7(7)e40439. doi: 10.1371/journal.pone.0040439.
178. Griewank KG, Yu X, Khalili J, Sozen MM, Stempke-Hale K, Bernatchez C, Wardell S, Bastian BC, Woodman SE. Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 March; 25(2): 182-187. doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00971.x.
179. Folberg R, Kadkol SS, Frenkel S, Valyi-Nagy K, Jager MJ, Pe'er J, Maniotis AJ. Authenticating cell lines in ophthalmic research laboratories. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 November;49(11):4697-4701. doi:10.1167/iovs.08-2324
180. Diebold Y, Blanco G, Saornil MA, Fernández N, Lázaro MC. Morphologic and immunocytochemical characterization of four human uveal cell lines (melanoma and melanocytes-derived). *Current Eye Research*, 16:5, 487-495, doi: 10.1076/ceyr.16.5.487.7047

181. Pons B, Armengol G, Livingstone M, López L, Coch L, Sonenberg N, Ramón y Cajal S. Association between LRRK2 and 4E-BP1 protein levels in normal and malignant cells. *Oncol Rep.* 2012;27(1):225-31. doi: 10.3892/or.2011.1462

XI. AGRADECIMIENTOS

XII. AGRADECIMIENTOS

De alguien escuché que una tesis es fruto de un proceso de maduración profesional, y yo me atrevo a decir que también personal. Es como una fruta, que no se cae del árbol hasta que está madura. Así que para llegar a este punto, yo también he pasado por un proceso similar en el que me han acompañado muchos familiares, amigos, colegas de profesión y mis maestros. A todos les debo agradecer que yo haya llegado hasta aquí.

Un agradecimiento sincero sale del corazón, permitidme continuar este capítulo en la lengua con la que pienso, siento y amo y con la que aprendí a hablar que es el Catalán.

No m'agradaria descuidar-me a ningú, perquè tots heu estat importants per mi. D'entrada vull agrair al Dr. Santiago Ramón y Cajal que m'introduís en l'estudi de la patologia ocular. Algú ho havia de fer..., però ell va fixar-se en mi per portar aquesta patologia al servei i jo vaig acceptar perquè... sempre m'han agradat les mostres petites i delicades. Així que vaig començar a veure "els ulls", inicialment amb el Dr. Pere Huguet, després uns dies a Madrid amb el Dr. Jose Luis Sarasa y finalment vaig poder fer una estada, curta però intensa, a Boston amb el Dr. Jakobiec. De tots he après i a tots els he d'agrair l'ensenyança que m'han donat. Ulls i òrbita, han esdevingut una àrea apassionant, ja que en aquesta petita part del nostre organisme hi esdevé una patologia molt variada.

En el diseny d'aquesta tesis hi han participat varies persones però vull tenir un record especial per en Carlos Parada, que va ser el meu primer director de tesis junt amb el Dr. Santiago Ramón y Cajal. Amb ell també vaig preparar la suficiència investigadora, un petit treball que era com un esboç de la tesis. Ell em va voler acompanyar a presentar-la a l'Hospital Clínic. D'aquell dia en recordo els meus nervis, la seva serena calma, la seva mirada atenta en la presentació i especialment l'esmorzar de premi que vam pendre en plena Rambla Catalunya. Malauradament en Carlos ens va deixar després de caure malalt... Carlos, allà on siguis, gràcies per engegar amb mi aquest projecte, pel teu suport, proximitat, implicació, pel teu tracte tant respectuós, la teva sinceritat, amistat i la il·lusió que dipositaves en la feina que feies.

Qui va agafar el seu relleu va ser en Javier Hernández, en Javi. Ell va reconduir el plantejament del meu treball i per mi ha estat no tant sols un director sinó també un tutor, company de professió i un bon amic amb qui he pogut comptar al llarg d'aquesta cursa. Sempre amb un somriure i disposat a ajudar-me malgrat la seva atapeïda agenda i per sobre de tot, mantenint la calma. Moltes gràcies Javi per la teva empatia, per guiar-me, escoltar-me i ajudar-me a tirar endavant.

Son molts els companys que han col·laborat amb mi d'una manera directe o indirecte els quals vull fer menció. El Dr. Francesc Tresserra de l'Institut Universitari Dexeus, per cedir-me bona part de les mostres histològiques així com els informes de l'anatomia patològica corresponents de la sèrie d'aquesta tesis, el Dr. Ramon Medel de l'IMO per aportar-me informació de les històries clíniques d'aquests casos, a més el Dr. Josep García-Arumí i el Dr. Tirso Alonso per cedir-me imatges clíniques d'aquest tumor per la iconografia d'aquest treball. La Pepa que em va localitzar tots els blocs de parafina, dels nostres casos, d'entre la multitud que guarda tant ordenadament a l'arxiu. La Teresa Moliné que de manera tant organitzada ha fet tots els talls histològics i les tècniques d'immunohistoquímica, sense perdre el bon humor, en el caos que és treballar amb tots nosaltres. La Carolina, la Melina, la Clara i l'Adrian que s'han implicat i col·laborat en la part dels treballs in vitro amb tanta dedicació i entusiasme i a la Dra. Pilar Martín Duque per cedir-nos les cèl·lules empleades en els mateixos. En Ray Buttler i en Manolo Quintana que han sabut transformar les dades d'una taula quasi infinita en la realitat d'uns resultats i d'unes gràfiques intel·ligibles. La Marga, que s'ha llegit de cap a peus el meu treball a fi de buscar els errors que jo ja no era capaç de veure i la Elena i en Vicente pels seus consells en els acabats i la impressió del mateix. Finalment en Carles Porta, el meu cunyat i fotògraf de professió, que m'ha ajudat amb el disseny de la portada i la Berta, la meva neboda, per consentir que li fotografiés un dels seus preciosos ulls per il·lustrar-la. A tots ells els vull agrair la seva participació en aquest treball.

Malgrat no hagi participat directament en la realització d'aquesta tesis, vull tenir unes paraules d'agraïment a qui ha estat la meva gran mestra, perquè ha estat important en el meu desenvolupament i maduració professional i m'ha donat empenta quan la necessitava, la Dra. Natàlia Tallada. Ella, entregada i apassionada de la seva feina, ha sabut transmetre'm el seu coneixement de forma totalment desinteressada. Amb ella he après a estimar la cèl·lula i la ciència que l'estudia, la citologia.

També vull dedicar unes paraules a la Dra. Landolfi que ha viscut aquesta tesis de primera mà com si fos la seva, a qui sempre consulto tots els meus dubtes informàtics i m'alegra els divendres posant música de fons al nostre despatx... Stefania, han estat moltes hores, molts dies juntes, moltes alegries i penes, riures i llàgrimes, problemes i il·lusions compartides. Gràcies perquè en tu sé que tinc una amiga.

I a tots els meus companys del servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, començant per l'equip de citologia amb qui treballo més directament però sense oblidar-me de ningú, patòlegs, residents, tècnics, infermers i administratius que son la meva gran família laboral i que entre tots han fet fàcil i divertit el meu dia a dia a la feina.

A més a més de l'esforç individual que implica fer un treball d'aquesta dimensió, en el meu cas la tesis ha comportat un sacrifici no sols personal sinó també familiar. Dic familiar perquè durant el temps que he estat dedicant a aquest projecte tota la meva família m'ha ajudat de manera que les meves absències alteressin mínimament el meu paper, les meves responsabilitats i obligacions en la mateixa.

En Josep i en Bernat, els meus fills, que son la llum i el motor del meu viure. En Ricard, el meu espòs, que en ell he trobat l'amor, l'equilibri i la pau del meu esperit. Els meus pares Josep i Carme, que m'han regalat la vida i m'han ensenyat a caminar-hi en el sentit més ampli i amb qui, junt amb la Marta i la Núria, les meves germanes, he viscut una infantesa plena de l'amor, felicitat i de la calidesa d'una llar. Finalment en Josep i l'Anna, que m'han abraçat com a una filla i a qui jo abraço com a uns pares. A tots vosaltres us vull dir que us estimo molt i agraeixo de tot cor l'ajuda que m'heu donat.

