

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UTILIDAD DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR) EN LA DETECCIÓN DE CELULAS  
METASTASICAS EN EL MELANOMA MALIGNO DE UVEA**

**Josep M<sup>a</sup> Caminal Mitjana**

Barcelona, Diciembre del 2000



A Emi, mi esposa y a mis guapisimas hijas Júlia y Marta, que han aguantado estoicamente mis encierros y que siempre me han dado esa sonrisa que tanto me gusta de ellas, cuando lo necesitaba.

A mis padres, que gracias a su esfuerzo me dieron la oportunidad de prepararme para el futuro.



#### AGRADECIMIENTOS:

Quiero mostrar mi agradecimiento a las diferentes personas que han hecho posible la realización de esta tesis.

- Al departamento de Oftalmología de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, por el respaldo que me han dado antes y durante la elaboración de este manuscrito. Destacando las aportaciones realizadas por el Dr. M. Quintana Casany, por el Dr. Guillermo Roca Linares, y por el Dr. Jordi Arruga Ginebreda.
- A la Dra. Dolors Colome que ha puesto a nuestra disposición su laboratorio de Hematopatología para el procesado de las muestras, así como su inagotable asesoramiento científico.
- Al Dr. José Luis Rosas y Francesc Garcia, del departamento de Bioquímica del campus de Bellvitge, con los cuales iniciamos este ambicioso proyecto, que quedo truncado por problemas técnicos, a pesar de su empeño.
- Al Dr. Josep M<sup>a</sup> Ramon, del Departamento de Epidemiología Clínica, y al Dr. Roman Pallares de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, por su disposición y asesoramiento en la valoración estadística de los datos del estudio.
- A la Dra. Josepa Ribas y sus colaboradores Sergi Sans y Ramón Subies, del Departamento de Epidemiología y registro del Cáncer, perteneciente al Institut català d'Oncologia de la CSUB, por su inapreciable ayuda en el tratamiento de datos mediante el programa SPSS, y en el asesoramiento en diversas consultas relacionadas con el mismo.
- A los Dres. I. de Waard-Siebinga, MJ. Jager, Guy Pelletier, A. Saornil y A. Morilla, por las facilidades para conseguir las líneas celulares de melanoma maligno de úvea.
- Al Departamento de Audiovisuales del Hospital de Bellvitge, y en especial a Jordi Linares por su colaboración en la digitalización de las imágenes y por el asesoramiento en la maquetación de este documento.
- A mi hermano, por su asesoramiento informático y por las facilidades en la impresión de este manuscrito
- A la familia y amistades por su entusiasmo, comprensión y tolerancia durante estos largos meses.



## **INDICE DE CONTENIDO:**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1. EPIDEMIOLOGIA DEL MELANOMA DE UVEA .....	25
2.1.1. <i>INCIDENCIA</i> .....	25
2.1.2. <i>EDAD Y SEXO</i> .....	25
2.1.3. <i>RAZA</i> .....	26
2.1.4. <i>FACTORES DE RIESGO DEL HUESPED</i> .....	26
a. Color iris .....	26
b. Nevus uveal .....	26
c. Melanocitosis ocular congénita .....	26
e. Neurofibromatosis .....	27
f. Genética .....	28
g. Historia familiar positiva .....	28
h. Estado Hormonal .....	28
2.1.5. <i>FACTORES DE RIESGO AMBIENTAL</i> .....	28
a. Exposición solar .....	28
b. Geografía .....	29
c. Exposiciones ocupacionales y químicas .....	29
d. Otras exposiciones ambientales .....	29
2.2. FACTORES PRONOSTICOS .....	31
2.2.1. <i>FACTORES CLINICOS</i> .....	31
2.2.2. <i>PARAMETROS HISTOPATOLOGICOS</i> .....	32
2.2.3. <i>PARAMETROS DE PROLIFERACIÓN CELULAR</i> .....	35
1. Contaje de mitosis .....	35
2. Valoración de la síntesis de ADN .....	35
3. Métodos de inmunohistoquímica .....	36
4. Regiones organizadoras nucleolares .....	37
2.2.4. <i>MORFOMETRIA Y CITOMETRIA DE FLUJO</i> .....	37
2.3. ANOMALIAS GENETICAS .....	41
2.3.1. <i>CITOGENETICA</i> .....	41
2.3.2. <i>ACTIVACION DE ONCOGENES</i> .....	41
2.4. DETECCION DE MICROMETASTASIS .....	45
2.4.1. <i>MICROSCOPIA ÓPTICA. CITOLOGIA</i> .....	45
2.4.2. <i>TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA. ANTICUERPOS MONOCLONALES</i> ..	46
2.4.3. <i>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA</i> .....	46
Componentes de la PCR .....	48
Técnica de la PCR .....	49
Transcripción reversa .....	50
2.5. ESTUDIOS CLINICOS MEDIANTE LA PCR PARA LA DETECCION DE MICROMETASTASIS EN TUMORES SOLIDOS .....	53
2.5.1. <i>MOLÉCULAS DIANA</i> .....	53
a. Alteraciones genéticas .....	54
b. Transformaciones víricas .....	56

c. Especificidad de tejido .....	56
d. Cáncer específico .....	57
2.5.2. MUESTRA ESTUDIADA.....	57
a. Biopsias .....	58
b. Sangre periférica .....	58
c. Ganglios linfáticos .....	59
d. Médula ósea .....	59
e. Líquidos biológicos .....	59
2.5.3. TUMORACIÓN PRIMARIA .....	60
a. Carcinoma colorrectal .....	60
b. Carcinomas abdominales .....	61
c. Cánceres de las vías urinarias.....	61
d. Carcinoma de próstata.....	61
e. Carcinoma de mama .....	62
f. Cánceres ginecológicos .....	62
g. Tumores neuroectodérmicos .....	63
h. Sarcoma de Ewing .....	63
i. Linfoma.....	63
j. Neuroblastoma .....	63
k. Melanoma maligno cutáneo .....	64
l. Melanoma maligno de úvea .....	69
2.6. MELANINA, MELANOGÉNESIS .....	71
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>73</b>
<b>4. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>77</b>
4.1. LINEAS CELULARES:.....	79
4.2. CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES DE MELANOMA MALIGNO DE UVEA Y VALORACION DE LA SENSIBILIDAD .....	81
4.3. SELECCIÓN DE PACIENTES .....	83
4.4. DATOS REGISTRADOS EN LOS PACIENTES EVALUADOS .....	87
4.4.1. DATOS CLÍNICOS.....	87
4.4.2. DATOS RELACIONADOS CON EL TUMOR.....	87
4.4.3. DATOS RELACIONADOS CON LA ANATOMIA PATOLOGICA .....	89
4.4.4. DATOS RELACIONADOS CON LA CIRUGIA.....	89
4.4.6. DATOS EVOLUTIVOS.....	90
4.5. CONTROLES .....	91
4.5.1. CONTROL NEGATIVO.....	91
4.5.2. CONTROL POSITIVO .....	91
4.6. TECNICA DE RT-PCR.....	93
4.6.1. EXTRACCIÓN SANGUÍNEA .....	94
4.6.2. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES .....	94
4.6.3. EXTRACCIÓN DE ARN .....	96
4.6.4. ANÁLISIS E INTEGRIDAD DEL ARN.....	97
Concentración del ARN .....	97
Integridad del ARN .....	98
4.6.5. RETROTRANSCRIPCIÓN .....	98
4.6.6. INTEGRIDAD DE ADNc. GEN ABL .....	99

4.6.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	99
4.6.8. VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA .....	102
4.6.9. PRODUCTOS COMERCIALES.....	105
4.6.10. SOLUCIONES PREPARADAS .....	107
4.7. VALIDACION DE LA RT-PCR EN LA DETECCIÓN DE METASTASIS .....	109
4.7.1. PROBABILIDADES PRE-PRUEBA .....	109
4.7.2. PROBABILIDADES POSTPRUEBA.....	109
<b>5. METODOS ESTADISTICOS .....</b>	<b>111</b>
5.1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA .....	113
5.2. ESTADISTICA INFERENCIAL.....	113
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>115</b>
6.1. PACIENTES.....	117
6.1.1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICAS.....	117
6.1.2. ANALISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES ANATOMO-PATOLÓGICAS .....	130
6.2. TECNICA RT-PCR .....	132
6.2.1. CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN .....	132
6.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN ABL.....	133
6.2.3. ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA .....	133
6.3. RESULTADOS EN RELACION CON LOS OBJETIVOS.....	134
6.3.1. SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR PARA DETECTAR CÉLULAS CIRCULANTES PROCEDENTES DE LINEAS CELULARES DE MELANOMA DE UVEA.....	134
6.3.2. DETECTAR MICROMETÁSTASIS EN PACIENTES DIAGNÓSTICADOS DE MELANOMA MALIGNO DE UVEA.....	135
6.3.3. VALIDACIÓN DE LA RT-PCR CON LAS TÉCNICAS CLÁSICAS EN LA DETECCIÓN DE METÁSTASIS.....	138
6.3.4. RELACION DE LOS FACTORES CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS CON LA LA PRESENCIA DE CÉLULAS CIRCULANTES.....	142
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>152</b>
<b>8. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>173</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>177</b>



## **INDICE DE ILUSTRACIONES:**

FIG. 1. ESQUEMA GENERAL DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	48
FIG. 2. ESQUEMA DE LA SÍNTESIS DE MELANINA .....	71
FIG. 3. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL ADN GENÓMICO Y LOCALIZACIÓN DE LOS CEBADORES. ....	72
FIG. 4. ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO DE LA RT-PCR.....	93
FIG. 5. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA TÉCNICA DE SEPARACIÓN CELULAR MEDIANTE GRADIENTE DE FICOLL. ....	94
FIG. 6. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA RT-PCR PARA EL ARNM DE LA TIROSINASA ...	102
FIG. 7. DISTRIBUCIÓN POR GRUPOS DE EDAD.....	118
FIG. 8. DISTRIBUCIÓN POR GRUPOS DE EDAD SEGÚN EL SEXO .....	118
FIG. 9. DISTRIBUCIÓN SEGÚN EL OJO AFECTO.....	119
FIG. 10. DISTRIBUCIÓN SEGÚN AGUDEZA VISUAL. ....	119
FIG. 11. DISTRIBUCIÓN SEGÚN ORIGEN TUMORAL.....	120
FIG. 12. DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA LOCALIZACIÓN SAGITAL .....	121
FIG. 13. DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA LOCALIZACIÓN CORONAL .....	121
FIG. 14. DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA LOCALIZACIÓN .....	122
FIG. 15. DISTRIBUCIÓN DEL MARGEN TUMORAL ANTERIOR Y POSTERIOR .....	123
FIG. 16. GRADO DE AFECTACIÓN DEL DISCO ÓPTICO EN FRANJAS HORARIAS .....	124
FIG. 17. GRADO DE AFECTACIÓN DEL CUERPO CILIAR EN FRANJAS HORARIAS .....	124
FIG. 18. GRADO DE AFECTACIÓN DEL IRIS.....	125
FIG. 19. GRADO DE AFECTACIÓN DEL ÁNGULO DE LA CÁMARA ANTERIOR. ....	125
FIG. 20. DISTRIBUCIÓN SEGÚN EXTENSIÓN .....	126
FIG. 21. DISTRIBUCIÓN SEGÚN EFECTOS SECUNDARIOS .....	127
FIG. 22. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN EL GRADO DE DESPRENDIMIENTO DE RETINA.....	127
FIG. 23. DISTRIBUCIÓN SEGÚN COMS .....	128
FIG. 24. DISTRIBUCIÓN SEGÚN EL TRATAMIENTO APLICADO.....	129
FIG. 25. INTEGRIDAD DEL ARN .....	132
FIG. 26. AMPLIFICACIÓN DEL GEN ABL.....	133
FIG. 27. SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR PARA LA LÍNEA CELULAR 92.1.....	134
FIG. 28. SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR PARA LA LÍNEA CÉLULAR SP8.0. ....	135
FIG. 29. SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR PARA LA LÍNEA CELULAR TP.31 .....	135
FIG. 30. AMPLIFICACIÓN DE LA TIROSINASA (PRODUCTO DE 207 PB DE LA 2ª PCR).....	136
FIG. 31. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE AFECTACIÓN DE LA RAÍZ DEL IRIS Y EL RESULTADO DE LA PCR. ....	142
FIG. 32. RELACIÓN ENTRE LA EXTENSIÓN CLÍNICA Y EL RESULTADO DE LA PCR. ....	143
FIG. 33. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE ENFERMEDAD DISEMINADA Y EL RESULTADO DE LA PCR. ....	143

FIG. 34. RELACIÓN ENTRE EL TIEMPO DE SEGUIMIENTO Y EL RESULTADO DE LA PCR.	144
FIG. 35. PORCENTAJE DE METÁSTASIS ACUMULADA CON EL SEGUIMIENTO RESPECTO AL RESULTADO DE LA PCR. (CURVAS DE KAPLAN-MEYER).....	145

## **INDICE DE TABLAS:**

TABLA 1. INCIDENCIA PUBLICADA DEL MELANOMA MALIGNO DE UVEA. ....	25
TABLA 2. MARCADORES TUMORALES SEGÚN MOLÉCULA DIANA.....	53
TABLA 3. RESUMEN DE PUBLICACIONES EN QUE SE UTILIZA LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE MICROMETÁSTASIS EN EL MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO .....	67
TABLA 4. UTILIZACIÓN DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DEL MELANOMA MALIGNO DE UVEA .....	70
TABLA 5. DILUCIONES DE LAS LÍNEAS CELULARES .....	81
TABLA 6. CLASIFICACIÓN TUMORAL SEGÚN EL COMS .....	88
TABLA 7. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS CLÍNICAS. ....	128
TABLA 8. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES ANATOMO-PATOLÓGICAS CUANTITATIVAS.	130
TABLA 9. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES ANATOMO-PATOLÓGICAS CUALITATIVAS.....	131
TABLA 10. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL ARNM DE LA TIROSINASA MEDIANTE LA RT- PCR EN PACIENTES PORTADORES DE MELANOMA MALIGNO DE UVEA Y EN EL GRUPO CONTROL.....	137
TABLA 11. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL ARNM DE LA TIROSINASA CON LA RT-PCR EN LOS PACIENTES PORTADORES DE MELANOMA MALIGNO DE UVEA, CONSIDERANDO LA PRESENCIA DE METÁSTASIS SISTÉMICAS.....	138
TABLA 12. VALORES DE LOS COCIENTES DE PROBABILIDADES POSTPRUEBA POSITIVOS, SEGÚN DIFERENTES PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD METASTÁSICA.....	141
TABLA 13. VALORES DE LOS COCIENTES DE PROBABILIDADES POSTPRUEBA NEGATIVOS, SEGÚN DIFERENTES PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD METASTÁSICA.	141
TABLA 14. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA.....	146
TABLA 15. CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLOGICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA.	150



## **INDICE DE ABREVIATURAS:**

- ADN. Acido Desoxirribonucleico.
- ADNc. Acido Desoxirribonucleico complementario.
- AFP. Alfa feto proteina.
- AgNORs. Tinción de plata de las regiones organizadoras nucleolares.
- AMV. Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis avia.
- CEA. Antígeno carcinoembrionario.
- DCC. Deleción genética en el cáncer colo-rectal.
- dCTP. Citosina desoxirribonucleotido trifosfato.
- dGTP. Guanina desoxirribonucleotido trifosfato.
- dNTP. Desoxirribonucleótidos trifosfato.
- dTTP. Timina desoxirribonucleotido trifosfato.
- EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- ER. Receptor estrógeno.
- HCV. Virus hepatitis C.
- HHV. Herpesvirus humano.
- HPV. Papilomavirus humano.
- IC. Intérvalo de confianza.
- JCV. Virus JC.
- LTD. Mayor diámetro tumoral (Largest tumor diameter).
- Mg<sup>2+</sup>. Magnesio.
- MgCl<sub>2</sub>. Cloruro de Magnesio.
- MLN. Media de los nucleolos más grandes.
- MMLV. Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney.
- dATP. Adenina desoxirribonucleótido trifosfato.
- MMTV. Virus de tumor mamario de ratón.
- NORs. Regiones organizadoras nucleolares.
- pb. Pares de bases.
- PCNA. Antígeno nuclear de proliferación celular.

- PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.
- PSA. Antígeno específico prostático.
- PSMA. Antígeno de membrana específico prostático.
- RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa.
- S. Fase celular de síntesis de ADN.
- SDNA. Desviación estándar de las áreas nucleolares.

## **1. INTRODUCCIÓN**



El melanoma de úvea es el tumor primario intraocular maligno más frecuente y junto al retinoblastoma constituyen las únicas enfermedades intraoculares primarias que pueden resultar mortales. Los melanomas del tracto uveal presentan una baja incidencia en la población general, siendo un octavo de la del melanoma cutáneo en los Estados Unidos<sup>1</sup>. Aun así son los melanomas malignos no cutáneos más frecuentes. La incidencia en pacientes blancos es 8 veces superior a la de los de raza negra.<sup>2</sup>

Estos tumores uveales constituyen una seria amenaza para la vida. Aproximadamente la mitad de los pacientes morirán de la enfermedad en 10 a 15 años a partir de la enucleación<sup>3</sup> y no son infrecuentes las metástasis que aparecen muchos años después del tratamiento. Los porcentajes de supervivencia a los 5, 10 y 15 años, basados en la mortalidad relacionada con el tumor son de 72%, 59% y 53% respectivamente, comparado con grupos controles pareados con la edad.<sup>4,5,6</sup>

El tratamiento clásico del melanoma maligno de úvea es la enucleación del globo ocular. Puesto que, es un tratamiento mutilante, en los últimos años se han introducido técnicas conservadoras en el arsenal terapéutico, con el objetivo de preservar la integridad del globo ocular. Entre las más difundidas están: la fotocoagulación con láser, la radioterapia (braquiterapia o teleterapia) y la resección quirúrgica transescleral. En cualquiera de los casos, el problema sigue siendo, como hemos comentado antes, la aparición de metástasis a distancia tras periodos de tiempo variables desde el tratamiento, lo cual, nos sugiere que un número de pacientes, en el momento del diagnóstico de la tumoración, presentan afectación microscópica a distancia no detectable mediante los métodos convencionales de rastreo (radiografía de tórax, análisis generales con marcadores hepáticos, y ecografía hepática). Estas células tumorales ocultas son las que denominamos micrometástasis.

En general, la diseminación hematológica de las células cancerosas, condiciona el pronóstico vital de los pacientes afectados por un cáncer. Así, es extremadamente importante poder discriminar este grupo de pacientes con metástasis subclínica, puesto que sería posible administrarles tratamiento coadyuvante, antes de la aparición de metástasis francas.

Dado que el número de células tumorales en sangre periférica es muy pequeño, y además el proceso de su implantación es poco efectivo<sup>7</sup>, las técnicas para su detección han de ser no sólo altamente sensibles sino también altamente específicas.

En la mayoría de los tumores sólidos, se detectan pocas células tumorales circulantes mediante las técnicas citológicas clásicas en sangre periférica, lo cual condiciona una sensibilidad muy baja<sup>8</sup> de dichas técnicas.

El uso de técnicas de inmunohistoquímica, depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos contra antígenos de la superficie celular tumor-específicos. Un ejemplo de este método es la detección de células de neuroblastoma en sangre periférica<sup>9</sup>. Con esta técnica, es posible detectar 1 célula tumoral entre  $10^4$ - $10^5$  células mononucleadas, presentando una sensibilidad superior a la de las técnicas citológicas clásicas. Sin embargo, mediante esta técnica, podemos obtener cierto grado de falsos positivos, lo cual limita su valor pronóstico.

. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>10</sup> y la PCR con transcripción reversa (RT-PCR) nos permiten detectar células cancerosas en sangre periférica. En el caso de la PCR, ello es posible mediante amplificación de secuencias específicas de ADN, por ejemplo la translocación del cromosoma Filadelfia<sup>11</sup> o mutaciones puntuales en el gen RAS<sup>12</sup>. En el caso de la RT-PCR, se lleva a cabo gracias a la detección de fragmentos específicos de ARN mensajero (ARNm). Para esta última técnica nos basamos en que las células tumorales continúan expresando características propias del tejido donde se

originan, hecho que nos ayuda a identificarlas cuando se ubican en localizaciones diferentes de las propias. La importancia de la RT-PCR se basa en su alta sensibilidad puesto que puede detectar una célula tumoral diluida entre  $10^6$ - $10^7$  células normales. Se cree que los melanocitos normales no circulan en sangre periférica, así para su detección podemos utilizar una amplia variedad de enzimas biosintéticos de la melanina, como proteínas específicas de tejido o bien antígenos específicos de células de la línea melanocítica.<sup>13,14</sup> La tirosinasa es un enzima que interviene en la síntesis de melanina, de la cual son conocidas su organización genómica y la secuencia de ADNc y además disponemos de cebadores para su amplificación. Es por ello que se ha seleccionado la tirosinasa como marcador específico de células tumorales circulantes, en el caso del melanoma maligno tanto cutáneo como de úvea.



## **2. REVISION BIBLIOGRAFICA**



## 2.1. EPIDEMIOLOGIA DEL MELANOMA DE ÚVEA

### 2.1.1. INCIDENCIA

En la actualidad existe consenso general en que la incidencia anual aproximada de melanoma maligno de úvea es de 6 casos por millón de habitantes en la raza blanca<sup>2</sup> de EEUU. Varios estudios corroboran esta afirmación. (Ver Tabla 1) La incidencia en personas de raza negra es desconocida pero se cree que es extremadamente baja<sup>15,16,17</sup>; en EEUU se estima que esta puede ser una octava parte que en la raza blanca.<sup>1</sup> Los niveles de incidencia y mortalidad del melanoma de úvea se han mantenido bastante estables en las últimas décadas.<sup>18</sup> Esto contrasta enormemente con la incidencia creciente del melanoma cutáneo en el mismo intervalo de tiempo.<sup>19</sup>

Tabla 1. Incidencia publicada del melanoma maligno de úvea.

<b>Año publicación</b>	<b>Autor</b>	<b>Incidencia por millón</b>
<b>1963</b>	Jensen (Dinamarca) <sup>3</sup>	7,5
<b>1977</b>	Shamas (EEUU) <sup>20</sup>	5,6
<b>1980</b>	Birsell (Canadá) <sup>21</sup>	6
<b>1983</b>	Abrahamsson (Suecia) <sup>22</sup>	7,2
<b>1987</b>	Egan (EEUU) <sup>23</sup>	6,5

### 2.1.2. EDAD Y SEXO

La edad media de diagnóstico es de alrededor de 55 años, y es excepcional su diagnóstico en la infancia.<sup>24,25</sup>

En un estudio hecho en Noruega se observó una menor incidencia en ambos sexos después de los 70 años.<sup>26</sup>

Según varias publicaciones, parece que el melanoma maligno de úvea es algo más frecuente en hombres que en mujeres.<sup>27,28,23</sup>

### 2.1.3. RAZA

El melanoma de úvea es una tumoración que es excepcional en razas que no sea la blanca. En EEUU la raza blanca presenta un riesgo de 8 veces superior a padecer este problema respecto de la raza negra.<sup>1</sup> En el caso de los negros de Africa, también se constata una baja incidencia en estudios realizados en dicho continente.<sup>29,17,15</sup> Asimismo es excepcional en Asiáticos<sup>30</sup> y en indios nativos.<sup>31</sup>

### 2.1.4. FACTORES DE RIESGO DEL HUESPED

Hay varios factores de riesgo del huésped tanto locales como generales que pueden predisponer a un individuo a padecer melanoma de úvea.

#### **a. Color iris.**

Los pacientes con iris claros ( azules o grises) presentan un mayor riesgo de desarrollar melanoma maligno de úvea. Esta observación, junto con el hecho de que la mayoría de melanomas de iris asientan en la mitad inferior del iris, implica la exposición solar como un posible factor contribuyente al desarrollo de melanomas uveales.<sup>32</sup>

#### **b.Nevus uveal**

Existe evidencia clínica y histopatológica que sugieren que la mayoría de melanomas de úvea crecen a partir de un nevus uveal benigno preexistente. En casos excepcionales se ha observado una aparición de novo<sup>33</sup>, es decir de áreas de coroides examinadas previamente y que eran normales.

#### **c.Melanocitosis ocular congénita.**

Las melanocitosis oculares congénitas son procesos unilaterales, congénitos, caracterizados por una hiperpigmentación de la epiesclera y del tracto uveal en el caso de la forma ocular, así como de la piel periorbitaria en el caso de la forma oculodérmica (Nevus de Ota). Las dos entidades son más prevalentes entre mujeres y en la raza asiática.

Probablemente la melanocitosis ocular y la melanocitosis oculodérmica son los factores predisponentes más importantes en el desarrollo de melanoma de úvea.<sup>34,35</sup> Ello se debe, en primer lugar a que se ha descrito la aparición de melanoma de úvea en un porcentaje del 5 al 25% de pacientes con esta entidad.<sup>36</sup> En segundo lugar se han descrito melanomas uveales bilaterales en pacientes con melanocitosis bilateral.<sup>37</sup> En tercer lugar se han publicado casos de melanomas múltiples en el mismo ojo de pacientes con afectación unilateral por esta entidad.<sup>38</sup> En cuarto lugar, se han descrito casos de melanocitosis ocular y desarrollo de un melanoma de úvea en pacientes de raza negra, cuya prevalencia de esta tumoración es muy baja.<sup>39</sup>

#### **d. Síndrome del nevus displásico.**

Los pacientes que presentan lesiones melanocíticas cutáneas hereditarias, lo que originalmente se denominaba B-K mole syndrome o que actualmente conocemos como el síndrome del nevus displásico, presentan una incidencia incrementada de melanoma cutáneo primario. Respecto a la mayor incidencia de melanoma maligno de úvea en pacientes con este síndrome, existen publicaciones dispares aunque las más recientes avalan la asociación entre los dos procesos. Por ello se recomienda un seguimiento periódico oftalmológico a los pacientes con nevus displásico y, a su vez, se aconsejan controles dermatológicos en los pacientes con melanoma de úvea, en busca del mencionado síndrome.<sup>40,41,42,43</sup>

#### **e. Neurofibromatosis**

Parece ser que los pacientes con neurofibromatosis presentan un aumento de incidencia de melanoma de úvea, así como de otras neoplasias. La mayoría de melanomas asociados con este síndrome son de iris, aunque también se han descrito melanomas de coroides.<sup>44,45</sup>

## **f. Genética**

Es posible que exista una predisposición al melanoma de úvea en los pacientes que presentan la mutación BRCA-2 en el cromosoma 13, que además predispone a la aparición de cáncer de mama y de ovario, con un riesgo durante la vida del 84% y 27% respectivamente.<sup>46</sup> Podemos encontrar esta mutación en aproximadamente un 2% de casos con melanoma de úvea.<sup>47</sup> Otros genes más frecuentes que predisponen al melanoma de úvea, son de baja penetrancia. Un ejemplo de gen de esta clase es el MC1R, que afecta la respuesta a la radiación ultravioleta en el huésped

## **g. Historia familiar positiva**

En general no existe una tendencia familiar al melanoma maligno de úvea, y se puede informar a los pacientes afectados que las posibilidades de que otro miembro de la familia, tenga un melanoma de úvea son remotas.

Se han publicado pocas series con casos familiares, en las que se ha constatado que en dichos casos, se suelen afectar parientes de primer grado y raramente se ven involucrados más de dos miembros de la familia. Parece asociarse a una predisposición hereditaria al cáncer.<sup>48</sup>

## **h. Estado Hormonal**

Al igual que en el melanoma cutáneo, se ha descrito un aumento de crecimiento del melanoma de úvea durante el embarazo, lo que sugiere una influencia hormonal.<sup>49</sup>

### **2.1.5. FACTORES DE RIESGO AMBIENTAL**

#### **a.Exposición solar**

Hay evidencia considerable de que la exposición solar contribuye a la formación del melanoma cutáneo. Parece ser que algo parecido sucede con el melanoma de úvea. La mayoría de melanomas que afectan al iris

se localizan en su porción inferior, que se justifica por la mayor insolación de dicha porción del iris, que esta menos protegida.<sup>32</sup>

Sin embargo no se ha observado un aumento de frecuencia de melanoma maligno de úvea en pacientes que toman con frecuencia el sol, tal como ha sucedido con el melanoma de piel.

### **b.Geografía**

No se sabe si la situación geográfica por si misma tiene alguna influencia en el desarrollo del melanoma de úvea.

### **c.Exposiciones ocupacionales y químicas**

Existe poca evidencia de que el melanoma de úvea este directamente relacionado con exposiciones laborales o tóxicas.<sup>2</sup> Hay un estudio que encuentra un mayor aumento de esta neoplasia entre los caldereros.

En cuanto a la a parición conubial algunas clases de neoplasias se observan simultáneamente en marido y mujer. Esta relación, recientemente, se ha encontrado en el melanoma de úvea.<sup>50</sup>

### **d.Otras exposiciones ambientales**

Esta descrito, en el caso de traumatismos perforantes, la aparición de un melanoma maligno de úvea en el punto de penetración de la herida en el del globo ocular.<sup>51,52</sup>



## **2.2. FACTORES PRONOSTICOS**

Los melanomas uveales metastatizan en fases relativamente tardías, pero en la actualidad no existe terapéutica para los pacientes que han desarrollado enfermedad a distancia. La supervivencia media después del diagnóstico clínico de metástasis hepáticas es muy baja, en general entre dos y siete meses.<sup>53,54</sup>

Para disminuir la mortalidad relacionada con el melanoma, es esencial prevenir o erradicar la enfermedad metastásica. Ello implica dos abordajes:

1. Desarrollo de factores pronósticos fiables, tanto clínicos como histopatológicos.
2. Detección precoz del proceso metastásico.

Aunque el melanoma cutáneo y el de la úvea proceden de un origen embrionario similar, difieren en su comportamiento biológico. El melanoma de úvea metastatiza preferentemente por vía hematógena primero hacia el hígado, mientras que el melanoma cutáneo se extiende hacia los nódulos linfáticos regionales. Esta diferencia se podría explicar por el hecho de que no se han demostrado linfáticos en el tracto uveal ni en la órbita posterior.

### **2.2.1. FACTORES CLINICOS.**

Los parámetros clínicos que clásicamente se han descrito como factores pronósticos son:

1. Diámetro tumoral mayor(LTD.Largest tumor diameter) <sup>4,53</sup>

La tasa de mortalidad a los 5 años en un metaanálisis realizado entre 1966 y 1988 sobre pacientes que fueron enucleados, fué del 16% para los tumores histológicamente pequeños (LTD <10 mm), del 32% para los medios (LTD 10-15 mm) y del 53% para los grandes (LTD > 15 mm)<sup>4</sup>

2. Presencia de invasión escleral o de extensión estraescleral<sup>53,55,56</sup>, que condiciona un peor pronóstico.

3. Margen tumoral localizado por delante del ecuador, con afectación del cuerpo ciliar y del iris,<sup>53,55,55,56</sup> que implica un peor pronóstico.

4. Edad.

Los pacientes con edades superiores a 40 años presentan un riesgo superior de metástasis<sup>57</sup>

5. Sexo.

El sexo masculino se asociaría a un peor pronóstico<sup>57,58,59</sup>

6. Glaucoma inducido por el tumor

La presencia de glaucoma se asocia a peor pronóstico<sup>60</sup>

7. Localización en el cuerpo ciliar

La afectación del cuerpo ciliar se asocia a peor pronóstico<sup>61</sup>

8. Presencia de desprendimiento de retina.

La existencia de desprendimiento de retina en el momento del diagnóstico condiciona un peor pronóstico<sup>61</sup>

9. Extensión a través de la membrana de Bruch.

La rotura de la membrana de Bruch por invasión tumoral implica una menor supervivencia.<sup>53</sup>

Además, en un estudio retrospectivo reciente<sup>62</sup> de 1329 tumores melanocíticos coroideos cuyo grosor no superase los 3 mm, se constataron como factores clínicos predictores de potencial metastásico:

1. Margen tumoral posterior en contacto con el disco óptico.
2. Altura tumoral superior a 1 mm.
3. Síntomas de visión borrosa.
4. Crecimiento documentado en el seguimiento.

Cuantos más factores posee un individuo, mayor es el potencial metastásico de su tumoración.

## 2.1.2. PARAMETROS HISTOPATOLOGICOS

Entre los factores pronósticos histopatológicos destacan:

1. Tipo celular.

Los melanomas uveales presentan un amplio espectro de tipos celulares que van desde tipos celulares fusiformes (spindle A y B) hasta tipos

epiteliodes. Las células tipo fusiforme tienden a crecer en un patrón compacto y cohesivo, y generalmente presentan una densa malla de fibras de reticulina. Las células clasificadas como epiteliodes crecen de manera menos cohesiva que las células fusiformes y no están rodeadas por una malla de reticulina.

En 1931 Callender desarrolló una clasificación citológica de estas tumoraciones<sup>63</sup>.

Las tumoraciones clasificadas como spindle A (5%), están formadas por células cohesivas que contienen un pequeño núcleo fusiforme, en el que a menudo se observa una franja central más densa (originada por un pliegue nuclear). No se identifican fácilmente los bordes celulares. Las figuras mitóticas son extremadamente raras. La supervivencia es aproximadamente del 92%.

Las tumoraciones clasificadas como spindle B (39%), están formadas por células cohesivas, con un prominente núcleo fusiforme con un nucleolo bien diferenciado. No se identifican fácilmente los bordes celulares. Las figuras mitóticas son raras. La supervivencia es de aproximadamente el 75%.

Las tumoraciones clasificadas como epiteliodes (3%) crecen de manera menos cohesiva que las células fusiformes, presentan un núcleo redondeado de gran tamaño, con un nucleolo prominente (habitualmente rosa), y un citoplasma abundante y rosado con unos bordes bien diferenciados. Cuando comparamos estas células con las spindle B, objetivamos un mayor tamaño nuclear y pleomorfismo. Son frecuentes las figuras de mitosis. La supervivencia es aproximadamente del 28%.

Los melanomas de tipo celular mixto, son los más frecuentes (45%) y están compuestos por una mezcla de células fusiformes (generalmente spindle B) y epitelioides. La supervivencia es de aproximadamente el 41%.

Los melanomas necróticos (7%), son aquellos en que la necrosis no permite identificar el tipo celular. Probablemente la necrosis es causada por un mecanismo autoinmune. La supervivencia es del 41%.

Posteriormente McLean propuso, para aumentar su reproductividad, una modificación de la clasificación de Callender, en: melanomas malignos de células fusiformes, melanomas de células mixtas y melanomas de células epiteliodes.<sup>64</sup>

La presencia de células epiteliodes se relaciona con un peor pronóstico, ya sea un tumor mixto o epiteliode.<sup>58,60</sup>

## 2. Actividad mitótica<sup>65</sup>

A mayor actividad mitótica peor pronóstico.

## 3. Diámetro tumoral máximo en contacto con la esclera (LTD.largest tumor diameter).

Diámetros tumorales superiores a 12 mm se relacionan con un peor pronóstico.<sup>53</sup>

## 4. Redes vasculares.

En los melanomas podemos encontrar diferentes patrones vasculares: zonas de avascularidad (silent pattern), patrón paralelo (straight pattern), patrón paralelo con cruces (parallel pattern with cross-linking), arcos (fragmentos de incurvaciones vasculares), loops (una isla de tumor está rodeada por un gran loop vascular) y networks (varios loops adyacentes). Publicaciones recientes han demostrado que la presencia de networks o de loops vasculares cerrados, es una característica que fuertemente se asocia, con mayor mortalidad por enfermedad metastásica.<sup>57,58,66,67,68</sup>

## 5. Presencia de linfocitos infiltrando el tumor. Más de 100 linfocitos infiltrando el tumor en 20 campos de gran aumento se relacionan con un peor pronóstico.<sup>57,58</sup>

### 2.2.3. PARAMETROS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

En el melanoma maligno de úvea se han estudiado diversos índices de proliferación celular comparándolos con los parámetros clinicopatológicos clásicos.

Entre los métodos para valorar la proliferación celular tenemos:

1. Contaje de mitosis
2. Valoración de la síntesis de ADN (S)
  - Citofotometría de flujo para estimar la fracción de ADN en fase S
  - Marcaje con timidina
  - Incorporación de un análogo de la timidina, como la bromodeoxiuridina
3. Métodos de inmunohistoquímica
4. Valoración de las regiones organizadoras nucleolares.

#### **1. Contaje de mitosis.**

La identificación de las células en mitosis es un método poco sensible puesto que sólo pueden contabilizarse como tales, aquellas células que inequívocamente están en esta fase. En el melanoma maligno de úvea, un elevado porcentaje de mitosis se relaciona con un peor pronóstico en numerosas publicaciones.<sup>57,69,70.</sup>

#### **2. Valoración de la síntesis de ADN.**

La citofotometría de flujo es uno de los métodos para cuantificar el ADN, en que un haz de láser cuantifica la fluorescencia del material nuclear en suspensión de 10.000 a 200.000 células, representando en una gráfica, las células en sus diferentes estadios del ciclo celular. Los tumores euploides presentan una cantidad normal de material genético, tanto 2c (diploide) o 4c (tetraploide). En la fase S del ciclo celular tiene lugar una duplicación de la información genética (ADN). Una elevada fracción de la fase-S refleja un elevado índice de proliferación. En el caso del melanoma maligno de úvea se ha encontrado una correlación

significativa entre una elevada fracción de la fase-S y una mayor celularidad epitelioide y un mayor tamaño tumoral<sup>71,72</sup>.

La captación de timidina o de bromodeoxiuridina, permite diferenciar las células que están en ciclo celular de las que no lo están, puesto que estas sustancias radiomarcadas sólo se incorporan durante la fase de síntesis del ciclo celular y por lo tanto se relacionan con el número de células que están en esta fase. Se ha demostrado una fuerte relación entre la captación de timidina o de bromodeoxiuridina y la aparición de metástasis.<sup>69,73</sup>

En general, el problema de todos estos métodos es que precisan de un equipo especializado, son laboriosos y no son fácilmente aplicables a la rutina diaria.

### **3.Métodos de inmunohistoquímica**

Los métodos inmunohistoquímicos de valoración de la actividad proliferativa, son fáciles de aplicar, relativamente baratos, se pueden emplear en preparaciones de cortes en parafina y son buenos marcadores de proliferación que determinan la fracción celular en fase S.<sup>71</sup>

En la clínica disponemos de los anticuerpos monoclonales Ki-67/Mib-1 y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Este último es una proteína nuclear de 36 kDa que funciona como una proteína auxiliar a la polimerasa delta ADN, y sus niveles son máximos durante la fase-S y G1 tardía. Actualmente disponemos de varios anticuerpos que reconocen al PCNA, entre los cuales el PC10 es activo en preparaciones en parafina.

En un análisis multivariante se evidenció que el Mib-1(Ki-67) era un parámetro pronóstico independiente en el melanoma maligno de úvea.<sup>70</sup>

En otros estudios se ha constatado que la actividad proliferativa definida por el Ki-67 y por el PC-10 PCNA, estaba disminuida en melanomas uveales, después de la irradiación previa a la enucleación.<sup>74,75</sup> En el caso del PC10 PCNA se ha comprobado una

relación con el pronóstico vital en algunos estudios<sup>76</sup>, pero no en todos<sup>77</sup>.

#### **4.Regiones organizadoras nucleolares**

Las regiones organizadoras nucleolares (NORs) son acúmulos de ADN nucleolar, que dirigen la transcripción del ARN ribosómico y sus proteínas asociadas. El tamaño y número de estas regiones, puede visualizarse mediante tinción de plata (AgNORs) que las tiñe como puntos negros. La aplicación de esta técnica al melanoma maligno de úvea evidencia una relación entre el conteo de AgNOR con las mitosis y con el tamaño tumoral. Sin embargo queda por definir el valor pronóstico del AgNOR.<sup>78</sup>

Este método es laborioso, pero no técnicamente complejo, ni caro.

#### **2.2.4. MORFOMETRIA Y CITOMETRIA DE FLUJO.**

La clasificación convencional de Callender presenta un elevado error interobservador.<sup>79,80</sup> Por ello fué simplificada para reducir el número de categorías y lo que mejoró la correlación de las características histológicas con el comportamiento maligno.<sup>64</sup> Sin embargo, los esquemas de clasificación morfológicos son inherentemente arbitrarios y están sujetos a variaciones en interpretación.<sup>56</sup> Por todo ello se desarrolló un sistema semicuantitativo para valorar el porcentaje de células epiteliodes de cada tumor<sup>53</sup>, la cantidad absoluta de células epiteliodes y la desviación estándar inversa del área nucleolar.<sup>81</sup>

Morfometría.

La morfometría es un método fiable para la cuantificación objetiva de las características nucleares y nucleolares, pero al igual que los métodos de marcaje de la síntesis de ADN, precisa de un equipamiento especializado, es laborioso y no puede ser aplicado a la rutina diaria. La desviación estándar de las características nucleares y, fué uno de los primeros métodos desarrollados para predecir el potencial de

malignidad de los melanomas de úvea, y confirmó el valor del pleomorfismo nuclear para anticipar su potencial maligno.<sup>82</sup>

La desviación estándar de las áreas nucleolares (SDNA), ha demostrado ser una medida útil de la malignidad del melanoma intraocular, sobre todo en conjunción con el diámetro tumoral (LTD).<sup>83</sup> Generalmente, las áreas nucleolares fueron mayores y más pleomórficas en los tipos celulares más malignos ( Tumores epiteloides o mixtos respecto de los fusiformes). Por desgracia, se trata de un método muy laborioso.

Recientemente se ha desarrollado un método más simple que consiste en calcular la media de los diámetros de los 10 nucleolos más grandes (MLN. Mean largest nucleoli) que mediremos en una franja de 5 mm de largo y una anchura de campo equivalente a la visión de un objetivo con aceite de inmersión y a través del centro del tumor.<sup>84</sup> La MLN, puede medirse más fácilmente que la SDNA y es más reproducible que el tipo celular y a la vez es un útil parámetro pronóstico.

En un estudio en que se comparan covariables pronósticas en el melanoma maligno de úvea, se demostró que el LTD, el tipo celular de Callender, la SDNA y la MLN presentaban una correlación equivalente respecto a la muerte relacionada con el tumor.<sup>85</sup> La MLN puede calcularse más fácilmente que la SDNA y es más reproducible que el tipo celular, y a la vez constituye un parámetro pronóstico de utilidad. En el análisis multivariante, cuando se añade el LTD como covariable pronóstica, tanto al tipo celular, como a la SDNA, o a la MLN se obtiene un incremento sustancial del valor pronóstico.<sup>85</sup>

### Citometría de Flujo

La citometría de flujo puede utilizarse para analizar el contenido celular de ADN y de ARN. La citometría de flujo del ADN es un método cuantitativo fiable para determinar el contenido de ADN (Ploidia) de una muestra de células tumorales. Cuando hay una desviación del valor normal de ADN (diploide) lo denominamos aneuploidia. Hay una evidencia creciente en varias neoplasias que la aneuploidia del ADN

puede correlacionar con un peor pronóstico vital. La aneuploidia puede reflejar una población celular genéticamente más inestable, con una capacidad incrementada para metastatizar.

Se ha demostrado una correlación significativa entre aneuploidia y células epiteloides.<sup>86</sup> Asimismo se ha comprobado que las alteraciones ploideas correlacionan más estrechamente con la supervivencia que los parámetros histológicos standard.<sup>71,86</sup>

Los nucleolos son puntos activos de síntesis de ARN, y la relación entre el contenido de ARN nuclear y el pronóstico fué determinado mediante la citometria de flujo utilizando naranja de acridina, un fluorocromo metacromático. En este estudio se constató que el contenido de ARN nuclear parecía ser un indicador pronóstico independiente en el melanoma maligno de úvea, y que un incremento en el contenido de ARN se asociaba con un peor pronóstico de vida.<sup>87</sup>



## **2.3. ANOMALIAS GENETICAS**

### **2.3.1. CITOGENETICA**

Las aberraciones cromosómicas tumorales más frecuentes se clasifican generalmente como estructurales o numéricas. Entre las alteraciones estructurales destacan: las translocaciones, inversiones, deleciones, inserciones y amplificaciones, mientras que las numéricas son pérdidas o duplicaciones de cromosomas completos.

Los estudios citogenéticos en el melanoma uveal muestran que la monosomía del cromosoma 3 y la multiplicación del cromosoma 8q aparece con mayor frecuencia en los melanomas de cuerpo ciliar, de modo que pueden asociarse con un subgrupo de melanomas de úvea cuyo pronóstico es desfavorable.<sup>88</sup> Recientemente ha sido demostrado que la monosomía 3 es el parámetro más significativo ( $p < 0.0001$ ) de mal pronóstico en el melanoma de úvea, seguido de la localización tumoral y el diámetro.<sup>89</sup>

También se han descrito aberraciones del cromosoma 6 (pérdidas o ganancias).<sup>90</sup>

En las líneas celulares procedentes de melanoma de úvea metastásico no se han encontrado aberraciones cromosómicas.<sup>91</sup>

### **2.3.2. ACTIVACION DE ONCOGENES**

El daño genético que encontramos en las células tumorales comprende dos categorías:

1. Proto-oncogenes. Promotoras de cáncer cuando son activados por mutaciones que los convierten en oncogenes. (gain-of-function)
2. Genes supresores tumorales o anti-oncogenes. Permiten la formación tumoral cuando son inactivados por mutaciones. (loss-of-function)

Hoy en día está ampliamente aceptado que las alteraciones moleculares en los oncogenes y en los genes supresores tumorales son responsables de la conversión de una célula normal en una célula tumoral.

Generalmente estos genes ejercen funciones normales en la proliferación y diferenciación celular.<sup>92</sup>

Varios oncogenes, entre ellos c-myc, se han localizado a nivel de 8q. En un estudio se ha asociado el porcentaje de células positivas a c-myc, con la mortalidad relacionada con el tumor. Además se encontró una fuerte correlación entre c-myc y el diámetro tumoral máximo (LTD).<sup>70</sup>

Una de las anomalías más frecuentemente encontradas en los cánceres humanos es la mutación del gen supresor p53 (TP53) denominado así porque la proteína que codifica es la p53.<sup>93</sup> Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 17(17p13) y codifica una proteína nuclear de 53kD que parece estar involucrada en la regulación del ciclo celular. El producto normal del p53 actúa como un supresor tumoral, pero varias mutaciones puntuales en la región codificadora del gen inactivan o alteran esta función. Alrededor de la mitad de los tumores esporádicos presentan alteraciones en el p53, y las mutaciones en las líneas germinales se asocian con el síndrome de Li-Fraumeni.<sup>94</sup>

Las mutaciones del p53 se han descrito en el 12-67% de los melanomas de la úvea.<sup>95,96</sup> Las mutaciones del p53 se encuentran con mayor frecuencia en melanomas epitelioides avanzados, que en las lesiones con celularidad fusiforme, sugiriendo que ésto podría ser un cambio genético tardío en la progresión del melanoma.<sup>95,96</sup> El melanoma maligno de úvea hereditario es extremadamente raro, pero una familia con una historia bien documentada de cuatro generaciones afectas en asociación con cáncer de mama, estaban ligados a anomalías del p53 en las líneas germinales.<sup>97</sup>

El gen CDKN2/INK4a en el cromosoma 9p21-22 es uno de los puntos de mira más frecuentes en busca de mutaciones cancerígenas.<sup>98</sup> El p16<sup>INK4a</sup> ejerce un importante papel en el melanoma. Las mutaciones en las líneas germinales condicionan en muchos casos la aparición de melanoma cutáneo hereditario, en cambio las mutaciones somáticas están frecuentemente presentes en el melanoma esporádico. Además,

las mutaciones CDKN2/INK4a se encuentran en hasta el 27% de melanomas de úvea.<sup>99</sup>

La evaluación de los niveles de ARNm de 21 diferentes oncogenes, anti-oncogenes, factores de crecimiento y proteasas en 17 líneas celulares de melanoma cutáneo muestran una correlación significativa entre los niveles de c-myc, p53 y c-src-1 (tirosinasa-quinasa), y entre el p53 y c-erb-B2 (Receptor EGF), lo cual puede ser debido a un control de regulación común entre estos genes en células de estirpe melanocítica.<sup>100</sup> Este hecho concuerda con la teoría de que la transformación oncogénica es un proceso de varios pasos, con la activación de al menos dos oncogenes.<sup>101</sup>



## **2.4. DETECCION DE MICROMETASTASIS**

El correcto estadiaje de los pacientes afectos de cáncer es una cuestión de máxima importancia para establecer la terapéutica más adecuada y el pronóstico vital.

En los estadios iniciales, la enfermedad metastásica es indistinguible de la enfermedad localizada. A menudo el diagnóstico de la enfermedad metastásica evidente se efectúa en las fases avanzadas del proceso, con lesiones macroscópicas en los estudios de imagen o bien con la elevación de marcadores séricos. Estas técnicas están limitadas por la necesidad de una masa tumoral crítica mínima. Por ejemplo, para detectar una tumoración en la tomografía computarizada se necesitan más de 1 billón de células tumorales. Por lo que una lesión metastásica puede pasar desapercibida durante mucho tiempo con las técnicas de diagnóstico convencionales. La identificación de las metástasis en sus estadios iniciales puede tener un impacto significativo en un determinado paciente en cuanto a tratamiento quirúrgico, radioterápico o sistémico.

### **2.4.1. MICROSCOPIA ÓPTICA. CITOLOGIA**

Históricamente han habido muchos intentos de determinar las células circulantes procedentes de tumores malignos en sangre periférica. Los primeros se llevaron a cabo usando el microscopio óptico para examinar las células retenidas en filtros después de pasar por ellos las muestras sanguíneas<sup>102,103,104,105</sup>.

En 1965, varios equipos de investigadores emplearon técnicas citológicas para estudiar células tumorales en 5000 pacientes con cáncer<sup>8</sup>. Los resultados preliminares demostraron un 96% de positividad, pero pronto observaron que estos resultados eran debidos a una baja especificidad en el desarrollo de la técnica. Algunos elementos sanguíneos, especialmente megacariocitos habían sido confundidos con células tumorales. Con la mejoría de las técnicas de

separación celular, que permiten un diagnóstico morfológico más preciso, se evidenció que la citología mediante microscopía óptica era un método de muy baja sensibilidad ( 1% de positivos). Por todo ello se abandonó el examen citológico de rutina de las muestras de sangre para detectar células tumorales.

#### 2.4.2. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA. ANTICUERPOS MONOCLONALES

El campo del estudio de las células tumorales y de la enfermedad mínima residual reapareció 20 años después, con la llegada de la inmunohistoquímica y de la utilización de anticuerpos monoclonales. Se desarrollaron tests inmunocitológicos sensibles para detectar células tumorales en médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) de pacientes con neuroblastoma<sup>106,107</sup>, melanoma maligno<sup>108,109</sup>, cáncer de próstata<sup>110,111</sup>, de pulmón<sup>112,113</sup>, de colon<sup>114,115</sup> y de mama<sup>116,117,118</sup>.

Mediante esta técnica se podía detectar 1 célula tumoral entre  $10^4$ - $10^5$  células mononucleadas (alrededor de 140 células por mililitro de sangre periférica), sensibilidad superior a las técnicas citológicas. Pero, los anticuerpos monoclonales utilizados en algunos estudios para llevar a cabo la reacción inmunohistoquímica, presentaban cierto grado de falsos positivos, lo cual limitaba su valor pronóstico<sup>118</sup>.

#### 2.4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica molecular, diseñada por Saiki y cols.<sup>119</sup>, que ha revolucionado la biología molecular y la ingeniería genética a finales de la década de los 80.

Esta técnica, permite en unas pocas horas la amplificación del orden de  $10^6$  a  $10^9$  veces de una secuencia conocida de un ácido nucleico, que está en una cantidad demasiado pequeña para su estudio y manipulación.

La primera descripción del uso de la técnica de la PCR para la detección de neoplasias es del año 1988, utilizada en la leucemia mieloide crónica y en la leucemia linfocítica aguda.<sup>120,121,122</sup> Desde entonces ha habido un

importante incremento de publicaciones en la literatura avalando la utilidad de la PCR en la detección de células tumorales. La primera aplicación en tumoraciones sólidas fué para la detección de células de melanoma cutáneo a nivel de la circulación sistémica, en el año 1991<sup>123</sup>. Mediante esta técnica se pudo detectar una sola célula de melanoma en 2 ml de sangre. Más adelante, en otro apartado, se resumen las publicaciones sobre este tema que han aparecido en la literatura.

La técnica de la PCR consiste en la expansión exponencial de un fragmento de ADN, acotado por unos oligonucleótidos denominados cebadores o “primers” (secuencias cortas de ADN, de 18 a 25 nucleótidos), mediante una ADN-polimerasa, bajo condiciones *in vitro* favorables. Así se producen una serie de reacciones cíclicas repetitivas en las que se van creando nuevas moléculas formadas a partir del ADN molde sintetizado en el ciclo anterior. De esta forma se producen  $ax2^{n-1}$  moléculas de ADN a partir de un número **a** inicial siendo **n** el número de ciclos de amplificación. Podemos ver un esquema general de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la Fig. 1.

Mediante la PCR podemos amplificar un fragmento de ADN tan pequeño como 40-50 pares de bases o tan largo como 10.000 pares de bases. La selección cuidadosa de los cebadores y la optimización de las condiciones del ensayo permiten la amplificación selectiva de un gen, y la secuenciación del producto amplificado verifica la especificidad de la prueba.<sup>124</sup> El descubrimiento de la PCR va asociado al del aislamiento de una enzima de polimerización del ADN llamada *Taq* polimerasa que es termoestable, es decir, capaz de soportar temperaturas de hasta 100°C sin que se altere substancialmente su actividad catalítica.

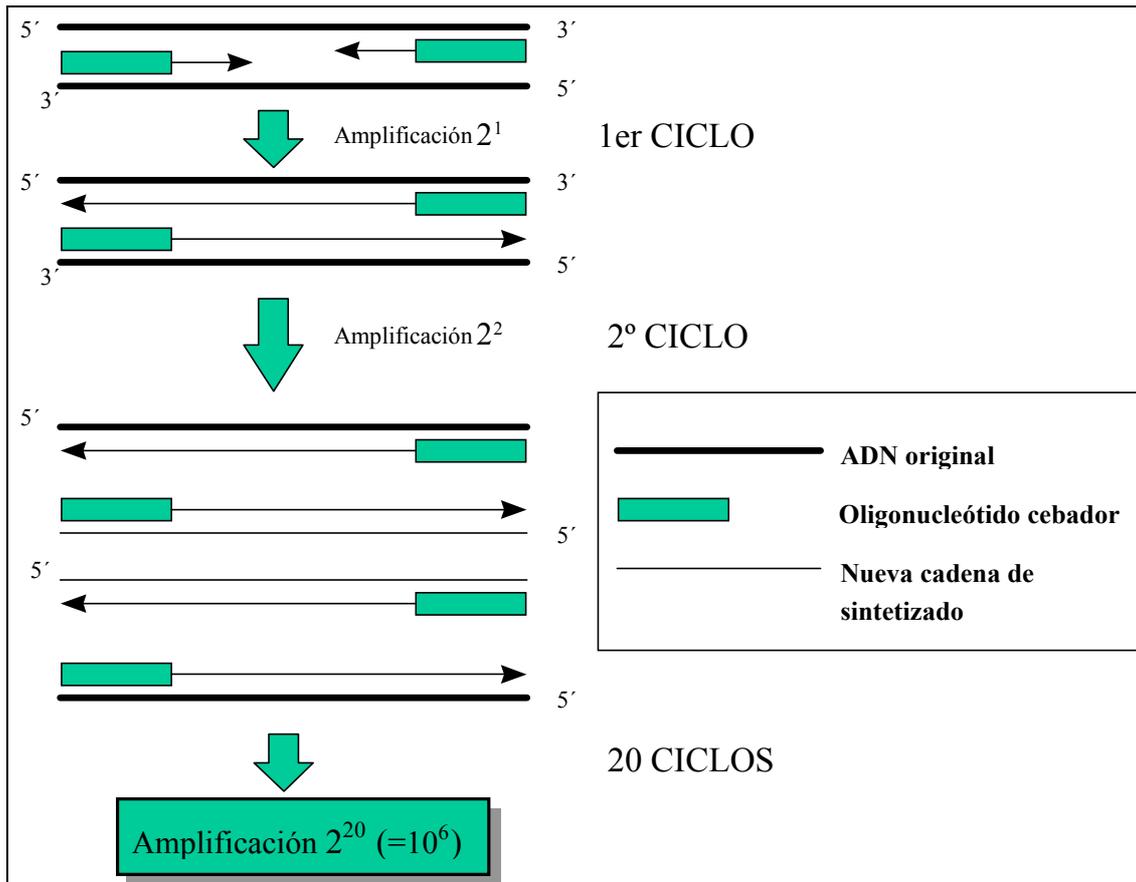


Fig. 1. Esquema general de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### Componentes de la PCR

Para la realización de la PCR se precisa de los siguientes elementos: ADN, *Taq* ADN polimerasa, desoxirribonucleótidostrifosfato (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), cebadores o *primers*, un tampón para la *Taq* polimerasa y agua. A continuación se especifica la función de dichos componentes.

#### 1. ADN molde.

El ADN molde contiene la secuencia que se va a copiar y amplificar.

#### 2. *Taq* ADN polimerasa

La *Taq* ADN polimerasa es una enzima con actividad ADN polimerasa  $5' \rightarrow 3'$ , es la encargada de la síntesis de la cadena complementaria del ADN que se va a copiar. Esta enzima de 94 Kd de peso molecular es termoestable y en una reacción de PCR tiene una vida media de 40 minutos a  $95^\circ C$ . Esta propiedad evita tener que añadir enzima fresca en

cada ciclo de amplificación. Igualmente la *Taq* ADN polimerasa precisa de un ADN molde de cadena simple y de un cebador para polimerizar.

### 3. Nucleótidos.

Los desoxirribonucleótidos trifosfato son necesarios para la síntesis de las cadenas de ADN que se van generando durante la PCR. Estos son utilizados normalmente a concentraciones saturantes de 200  $\mu$ M para cada dNTP.

### 4. Cloruro de Magnesio.

El  $MgCl_2$  es indispensable para la actividad ADN polimerasa asociada a la *Taq* ADN polimerasa. La concentración óptima de  $Mg^{2+}$  se calcula experimentalmente y depende de la cantidad de dNTPs y de la secuencia molde a amplificar.

### 5. Cebadores.

Para la PCR se requieren dos cebadores o primers. Estos son fragmentos de ADN monocatenario de entre 15 a 30 desoxirribonucleótidos complementarios a cada una de las dos hebras de ADN molde y que delimitan la longitud del fragmento de ADN que se amplifica. Ambos oligonucleótidos tienen una secuencia diferente y cada uno de ellos se une a una de las dos cadenas de ADN, de tal manera que tenemos un cebador *upstream* que se une al extremo 5' del ADN y uno que se une al extremo 3'. Estos cebadores son indispensables para que la *Taq* ADN polimerasa pueda ejercer su acción y los extienda desde su extremo 3'.

La concentración de los cebadores en la PCR tiene que estar siempre en exceso respecto del ADN molde y normalmente oscila entre 0,1 y 1  $\mu$ M.

Todas las reacciones de la PCR se realizan en un termociclador, es decir un incubador programable, en el que podemos introducir diferentes temperaturas y tiempos a fin de combinarlos respectivamente.

## **Técnica de la PCR**

Esencialmente la PCR podemos dividirla en tres etapas principales:

\*Una primera fase en que el ADN molde es desnaturalizado para separar sus dos cadenas.

\*Seguidamente se procede a la PCR propiamente dicha, es decir a la fase en la que el ADN es amplificado. Esta etapa está constituida por una serie de ciclos, cada uno de los cuales está dividido en tres partes:

1. Fase de desnaturalización del ADN.

Normalmente las dos cadenas del ADN molde se separan calentando a 95°C de 1 a 5 minutos. Este tiempo depende de la longitud de la cadena de ADN, incrementando el tiempo cuando se desnaturaliza ADN genómico de alto peso molecular.

2. Fase de unión de los cebadores al ADN.

Que se realiza a una temperatura calculada experimentalmente y que depende de la secuencia y longitud de los cebadores. En condiciones normales va desde 50 a unos 70°C y se aplica entre 30 segundos y un minuto.

3. Fase de polimerización o elongación.

Se realiza a 72°C ya que coincide con la temperatura óptima de la Taq ADN polimerasa. A esta temperatura la polimerasa añade unos 400 nucleótidos por minuto. El tiempo de elongación se incrementa cuando queremos amplificar fragmentos de un peso molecular mayor.

Estos ciclos son repetidos un número n de veces.

\*Una vez finalizada la PCR, se procede a visualizar los productos mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa (2%), con tinción de los productos de la PCR con bromuro de etidio.

### **Transcripción reversa**

La transcripción reversa-PCR (RT-PCR), permite la detección de ARN, lo cual amplía las posibilidades de la PCR. La RT-PCR comprende una reacción enzimática de conversión de ARN a ADNc, catalizada por la enzima transcriptasa reversa. Disponemos de dos variantes de esta enzima, que son:

- AMV. Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis avia

- Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney

La cadena de ADNc generada es amplificada mediante PCR convencional. Aunque los productos iniciales de la RT-PCR y de la PCR son diferentes, el producto de la reacción final es siempre ADN, que puede ser utilizado para su análisis molecular.



## 2.5. ESTUDIOS CLINICOS MEDIANTE LA PCR PARA LA DETECCION DE MICROMETASTASIS EN TUMORES SOLIDOS

Se han publicado numerosos estudios clínicos para detectar la enfermedad mínima residual en tumores sólidos. que se han revisado y sintetizado de acuerdo con la molécula diana utilizada, con el tumor primario y con la localización secundaria examinada.

### 2.5.1. MOLÉCULAS DIANA

El análisis mediante PCR puede diseñarse para detectar una célula utilizando una estructura molecular específica -diana-. Las diversas moléculas diana y las razones para su utilización se encuentran resumidas en la Tabla 2 y detalladas más adelante. Estas moléculas diana pueden detectarse en la sangre periférica, en los nódulos linfáticos, en las biopsias de las localizaciones primarias y secundarias, en la médula ósea y en otros fluidos corporales.

Tabla 2. Marcadores tumorales según molécula diana

	Mecanismo	Diana molecular
<b>Alteraciones genéticas</b>	Traslocaciones cromosómicas	t(11;22); t(14;18); cromosoma Philadelphia t(9;22); t(15:17); (q24;q21); bcr/abl
	Mutaciones puntuales	p53, ER, ras
	Delecciones	BRCA1, BRCA2, DCC
	Alternative splicing	CD44, muc-1, integrin VLA-4
	Amplificaciones	erb-B2, EGFR, N-myc, ras
<b>Transformación viral</b>	Ratios alteradas	Gelatinasa A/TIMP2
	<b>Tejido específico</b>	HPV, HHV-8, JCV, HCV, MMTV
<b>Cáncer específico</b>		PSA, PSMA, muc-18, queratina, albumina, maspin, tiroglobulina, NPGP 9.5, hormona paratiroidea, tirosinasa, p97, muc-18, Mage-3, AFP, tirosina hidroxilasa, surfactante
		CEA, $\beta$ -HCG, queratina-19, K-ras, citoquinas telomerasa, microsatélite, receptor endotelina.

ER: receptor estrógeno; DCC: delección genética en el cáncer colo-rectal; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HPV: papilomavirus humano; HHV: herpesvirus humano; JCV: virus JC; HCV: virus hepatitis C; MMTV: virus de tumor mamario de ratón; PSA: antígeno específico prostático; PSMA. antígeno de membrana específico prostático; AFP. alfa feto proteína; CEA: antígeno carcinoembrionario.

### **a.Alteraciones genéticas.**

Las células cancerígenas experimentan típicamente, una serie de alteraciones genéticas para desarrollar su potencial metastásico. Podemos detectar estas alteraciones en la expresión genética a nivel tanto de ARNm como de ADN. Debido a la clonicidad de la mayoría de los tumores, las alteraciones genéticas están restringidas al propio tumor y no se encuentran presentes en el tejido normal. Esta diferenciación permite la detección de la célula cancerígena tanto en su localización primaria como en la secundaria, con un cierto grado de especificidad.

Las translocaciones cromosómicas, se hallan característicamente en leucemias y linfomas específicos, tal como encontramos en la leucemia mielocítica crónica  $t(9;22)$ (cromosoma Philadelphia), en la leucemia promielocítica aguda  $t(15,17)$ , y en los linfomas no Hodgkinianos  $t(14;18)(q24;q21)$ .<sup>125, 126, 127</sup>

Son excelentes secuencias para el diagnóstico con la técnica de PCR, los genes procedentes de la reorganización en el punto de rotura, tras la fusión cromosómica.

La RT-PCR fué utilizada ya en el año 1988, para determinar el ARNm de la translocación bcr/abl en sangre periférica de la médula ósea en pacientes con leucemia mieloide crónica<sup>128</sup>.

La RT-PCR es capaz de detectar con una gran sensibilidad, reagrupaciones cromosómicas específicas asociadas al linfoma de células B<sup>129,130,131</sup>, o al Sarcoma de Ewing<sup>132,133</sup>,. Sin embargo, las translocaciones no son únicas de un tumor específico, tal como se evidencia por la translocación  $t(11;22)$  característica del sarcoma de Ewing, que también pueden evidenciarse en neuroepiteliomas periféricos, tumores de Askin y en estesioblastomas.<sup>134</sup>

No todas las translocaciones son adecuadas para su detección mediante la técnica de la PCR. Algunas roturas cromosómicas, especialmente  $t(8;14)(q24;q32)$  que se observa en el linfoma de Burkitt, son altamente

heterogéneas respecto de su posición en el ADN y expanden un área demasiado larga para unos primers específicos.

También pueden detectarse mutaciones puntuales, deleciones, reagrupaciones genéticas y amplificación de oncogenes, genes supresores tumorales, factores de crecimiento, o sus receptores.<sup>135, 136</sup>

La detección de algunas alteraciones genéticas tiene implicaciones pronósticas, como la sobreexpresión de *erb-B2* en el 30 % de carcinomas de ovario y en algunos carcinomas de mama<sup>135</sup>, que se asocian a una evolución más desfavorable. Datos similares se han publicado acerca del gen *n-myc* en el neuroblastoma<sup>137,138</sup>.

A diferencia de las reagrupaciones cromosómicas, las reagrupaciones genéticas son a menudo submicroscópicas.

Las mutaciones puntuales pueden estar restringidas a sustituciones de bases específicas en un punto específico, tal como puede verse en la familia *ras*.

El gen *ras* es un ejemplo de mutación puntual, en el que, solamente hay cambios en tres codones específicos, detectándose en 20-65% de muestras de carcinoma colorrectal<sup>139, 140, 141</sup> y en 50-75% de muestras de carcinoma pancreático.<sup>142, 143</sup>

Sin embargo, muchas mutaciones puntuales a menudo no son específicas para un nucleótido concreto y tienden a mutar el gen en múltiples puntos, tal como sucede con el gen tumor supresor p53 en el locus cromosómico 17p. Para detectar las diferencias entre el ADN nativo y el mutado en base a la estructura secundaria es útil la utilización de la técnica del polimorfismo de conformación de cadena sencilla (PCR-SSCP, single strand conformational polymorphisms).

Las alteraciones del gen p53 se encuentran con frecuencia en muchos cánceres humanos, pero se ha comprobado su asociación con el síndrome de Li-Frumeni, para la tumorigénesis.<sup>144</sup>

## **b.Transformaciones víricas.**

Actualmente sabemos que los virus son capaces de inducir cáncer<sup>145</sup>. La presencia de genes víricos o de productos genéticos en las células cancerosas nos permite detectar las células transformadas.

En los carcinomas de cérvix, la detección de subtipos específicos de papilomavirus humanos (HPV-16 o HPV-18 vs. HPV-6 o HPV-8), ha derivado en implicaciones pronósticas.<sup>146, 147, 148, 149</sup>

También se han encontrado virus del herpes humano 8 (HHV-8) en pacientes afectos de sarcoma de Kaposi o leucemia del adulto por virus de la leucemia de células T humana (HTLV-1).<sup>150</sup>

En otros cánceres no está claro si las secuencias víricas están presentes de manera latente en la célula transformada o si realmente juegan un papel en su transformación. Por ejemplo, según un estudio el virus de la hepatitis C se detectó en un 23% de los carcinomas hepatocelulares, si bien fué también detectado en 61% de las muestras hepáticas de control.<sup>151</sup>

## **c.Especificidad de tejido.**

La expresión específica de un gen en un tejido permite el desarrollo y diferenciación única de cada tejido, y es de gran valor para el diagnóstico del cáncer. En pacientes afectos de cáncer, encontramos un aumento de marcadores específicos de tejido, debido a un incremento de células productoras de estos marcadores. En la actualidad el marcador mejor estudiado es el antígeno específico prostático (PSA) y el antígeno de membrana específico prostático (PSMA) en el cáncer de próstata.<sup>152</sup> Otros marcadores son la hidroxilasa tirosina para el neuroblastoma; y la tirosinasa y queratina para el melanoma maligno.

Sin embargo, para la mayoría de marcadores, la expresión de tejido específico es relativa y no absoluta. Este hecho, comporta que tejidos normales y benignos también pueden expresar estos marcadores, al igual que pueden hacerlo ciertos procesos proliferativos benignos (hiperplasias y adenomas). Por lo tanto, la RT-PCR puede emplearse para detectar estos marcadores en localizaciones secundarias, con

expresión no conocida del gen marcador. Por ejemplo, la mayoría de los estudios indican que las células que expresan el PSA no se encuentran normalmente en la sangre periférica o en los ganglios linfáticos, por lo que esta prueba puede utilizarse para detectar expresión de PSA en estas localizaciones, y por lo tanto su presencia es compatible con metástasis.

Los marcadores específicos de tejido presentan una gran especificidad y una variable sensibilidad. Por ejemplo en pacientes con melanoma cutáneo, no puede detectarse la expresión de la tirosinasa en los pacientes controles (especificidad del 100%), en cambio la sensibilidad de la detección de tirosinasa en la sangre periférica, varía del 0 al 100%. Lo mismo sucede con el PSA, con un 100% de especificidad y un 22-80% de sensibilidad en muestras de sangre periférica.

#### **d.Cáncer específico.**

Los marcadores cáncer específicos son aquellos que están elevados en la mayoría de cánceres. Se han postulado diversos marcadores que se expresan por tipos de cáncer diverso como el antígeno carcinoembrionario (CEA), citoquinas, telomerasas y la gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -HCG)<sup>153,154,155,156,157</sup>

Estos marcadores ofrecen la ventaja de que con una sola determinación es posible hacer un escrutinio para varias neoplasias. Sin embargo, pueden darse elevaciones de estos marcadores, de manera inespecífica (por ejemplo, la  $\beta$ -HCG en los embarazos; y las citoquinas en procesos infecciosos o inflamatorios). Además, estos marcadores, aunque en teoría son específicos de cáncer, también pueden expresarse en células benignas y normales.

#### **2.5.2. MUESTRA ESTUDIADA**

Mediante la PCR podemos estudiar diferentes tejidos corporales, en busca del proceso metastásico. Por un lado, podemos estudiar la

propia tumoración obtenida mediante biopsia o bien mediante exéresis, y por otro, los ganglios linfáticos, la médula ósea, la sangre periférica y otros líquidos biológicos..

### **a.Biopsias**

La biopsia de una tumoración sólida permite su análisis directo. En aquellos tumores que metastatizan mediante extensión directa, la técnica del PCR nos ofrece una prueba más sensible para la detección de células malignas en la periferia del tumor, en comparación al análisis tradicional histopatológico.

La PCR, nos permite la caracterización simultánea de múltiples marcadores, con una muestra relativamente pequeña. El análisis de los marcadores metastásicos o de los serotipos virales congénitos, pueden ayudarnos como indicadores de pronóstico, tal como sucede con el carcinoma cervical y los serotipos del HPV<sup>158</sup>, o en el carcinoma hepático y el VHC<sup>159</sup>.

### **b.Sangre periférica.**

En los rastreos para cáncer, la sangre venosa constituye una muestra accesible y barata.

Tradicionalmente, las muestras sanguíneas, permiten la detección de células cancerosas en pacientes afectos de neoplasias hematopoyéticas. También nos permiten el diagnóstico de neoplasias no hematopoyéticas, que se extienden desde su localización primaria por vía sanguínea. Cualquier marcador ausente en la sangre periférica puede ser considerado para su uso en la detección de células cancerígenas, especialmente los marcadores de tejido específicos. Este abordaje ha permitido detectar células tumorales circulantes, en muchos pacientes con metástasis por adenocarcinoma prostático, melanoma maligno cutáneo, cáncer de mama, neuroblastoma y carcinoma hepatocelular. Estos tests generalmente son específicos a los marcadores tumorales, pero están limitados por la sensibilidad del ensayo. Por ejemplo, aunque la mayoría de estudios son incapaces de detectar células que expresan

el marcador en la población control, la sensibilidad publicada de la RT-PCR varia de 0% a 100% para la detección de células circulantes que expresan tirosinasa, en pacientes con melanoma metastásico franco.<sup>160,161,162,163,164,165</sup>

### **c. Ganglios linfáticos.**

Se han detectado células tumorales en pacientes afectos de cáncer, mediante la RT-PCR, en las biopsias de ganglios linfáticos. La RT-PCR ha sido más sensible que los métodos tradicionales basados en anticuerpos, puesto que ha detectado la expresión de un marcador tumoral en un grupo de ganglios linfáticos que habían sido negativos mediante inmunohistoquímica. Además, en estudios retrospectivos de muestras de ganglios linfáticos incluidos en parafina y fijados con formol, se ha demostrado que aquellos pacientes que fueron negativos mediante histopatología convencional, pero positivos mediante RT-PCR, a lo largo de su seguimiento desarrollaron enfermedad metastásica durante los 5 años postoperatorios. Estos datos sugieren que el estadiaje de los ganglios linfáticos mediante RT-PCR puede ser un mejor predictor de la recurrencia de un cáncer<sup>166,167,168</sup>.

### **d. Médula ósea.**

En un porcentaje significativo de pacientes afectos de cáncer confinado a un órgano, se obtienen a partir de los aspirados de médula ósea células que expresan un marcador tumoral. Estudios clínicos han demostrado una buena correlación entre los enfermos con médula ósea positiva mediante PCR y un estadiaje histopatológico superior, así como con la diseminación metastásica<sup>169,170,171,172</sup>.

### **e. Líquidos biológicos.**

Varios líquidos biológicos, además de la sangre, ofrecen una buena accesibilidad para el análisis. Entre ellos, se encuentran el líquido ascítico de los pacientes con carcinoma hepatocelular o pancreático, la orina de pacientes con carcinoma de células transicionales<sup>173</sup>, las heces

de pacientes con carcinoma colorrectal<sup>174,175</sup>, y el esputo de pacientes con carcinoma pulmonar<sup>176</sup>. Entre estos, los datos procedentes de la orina son más prometedores, puesto que se ha encontrado que las células exfoliadas de carcinoma de vejiga con mutaciones p53 o con alteraciones microsátélites, son predictivas de carcinoma de células transicionales<sup>173</sup>.

### 2.5.3. TUMORACIÓN PRIMARIA

La biología individual de cada tipo de cáncer es diferente en cuanto a alteraciones genéticas, características de crecimiento, y predilección anatómica para la expansión metastásica. Con el objetivo de detectar micrometástasis, se han estudiado mediante la PCR un número creciente de cánceres.

#### **a.Carcinoma colorrectal.**

Entre los marcadores utilizados para detectar células de carcinoma colorrectal se encuentran: las mutaciones puntuales en *K-ras*; la delección del gen DCC (deleted-in-colorectal-cancer gen); los marcadores de tejido específico queratina-19, queratina-20 y citoqueratina-20; y el marcador de cáncer específico CEA.<sup>177,178,179,180,181,182</sup>

En el caso del gen DCC, aunque su nombre implique otra cosa, no encontramos la delección de este gen en la mayoría de biopsias de carcinoma colorrectal (57% sensibilidad)<sup>177</sup> La forma mutada de *K-ras* presenta una sensibilidad del 20-65%, en biopsias de muestras de tumor, y está presente en muestras no tumorales (especificidad del 75%). El marcador queratina-19 y 20, es un marcador específico de epitelios y no de carcinoma colorrectal, detectándose además en un porcentaje importante de controles negativos. En el caso de la citoqueratina-20 se requieren más estudios para establecer su relación con el carcinoma colorrectal.<sup>180,181</sup> El marcador de cáncer específico

CEA, se ha detectado de manera variable (43%-84%) en sangre periférica, médula ósea y biopsias de tejido.<sup>183, 154</sup>

### **b.Carcinomas abdominales**

Entre los marcadores del carcinoma gástrico están la translocación cromosómica t(11;22), los virus del papiloma humano (HPV-16 y -18), la presencia de *Helicobacter pylori*, formas específicas de tejido de la queratina-19, el marcador de cáncer específico CEA y las citoquinas inmunosupresoras.<sup>184,185,,186,187,188</sup>

Para la detección de marcadores específicos de expresión genética en el caso del cáncer de hígado se han utilizado, la alfa-fetoproteína (AFP), la albumina y algunos virus (virus hepatitis B y C)<sup>189,190,191,192</sup>

Alrededor del 90% de los adenocarcinomas de páncreas presentan mutaciones del codón 12 del gen K-ras.<sup>193,194</sup>

### **c.Cánceres de las vías urinarias.**

En el caso de carcinomas de células transicionales se han determinado, mutaciones del gen p53 y del gen supresor tumoral del retinoblastoma, mutaciones del oncogén H-ras y la presencia de secuencias del virus papiloma humano.<sup>195,196,197</sup>

### **d.Carcinoma de próstata.**

La RT-PCR para la detección de carcinoma de próstata ha sido uno de los modelos mejor estudiados, debido a la especificidad del antígeno específico prostático (PSA) para las células prostáticas. Aunque los marcadores más utilizados han sido el antígeno específico prostático (PSA) y el antígeno de membrana específico prostático (PSMA), también se han estudiado las mutaciones del gen p53, y la presencia del virus del papiloma humano (VPH).<sup>198,199,200,201,202</sup>

Los estudios clínicos nos muestran que la RT-PCR puede detectar células circulantes que expresan el PSA y el PSMA, en un porcentaje elevado de pacientes con enfermedad metastásica y en un subgrupo de pacientes con enfermedad localizada.

Las sensibilidades publicadas en la detección de las células que expresan el PSA en sangre periférica, varían de 0% al 88% y en las que expresan el PSMA, varían del 50% al 85%.<sup>203,204,205,206,207,208,209</sup>

#### **e.Carcinoma de mama**

Existen numerosos estudios de marcadores que se asocian con el carcinoma de mama, y entre ellos se encuentran: deleciones del gen BRCA; amplificación de MDR-1 y HER-2/*neu*; mutaciones en el p53; isoformas de CD44; virus tumorales; marcadores específicos de tejido, como la queratina, citoqueratina, maspina y receptores de estrógenos; y también marcadores específicos de cáncer, como la telomerasa, PSA,  $\beta$ -HCG y CEA.<sup>210,211,212,213,214,215</sup>

La detección de marcadores específicos de epitelio como la queratina-19 y la citoqueratina-19, presenta generalmente una buena correlación con la presencia de metástasis. Los estudios clínicos con estos marcadores, suelen presentar una elevada sensibilidad (90-100%) y una elevada especificidad(90-100%).<sup>214,215,216</sup>

La expresión del gen de la telomerasa puede estar muy elevada en todos los cánceres, y se detecta sobre todo en la mayoría de los pacientes con carcinoma de mama metastásico (77%), en algunos pacientes con un carcinoma confinado al órgano en cuestión (6%) y en ningún paciente sin carcinoma de mama. (0%).<sup>217</sup>

No se detectan similares asociaciones entre marcadores específicos de cáncer y el carcinoma de mama, entre ellos: PSA;  $\beta$ -HCG, o CEA.<sup>183,184</sup>

#### **f.Cánceres ginecológicos**

La mayoría de trabajos en cánceres ginecológicos han valorado el estudio del tejido tumoral o de los ganglios linfáticos en busca de la presencia de papilomavirus humanos, mediante la técnica de PCR.

Por lo que se refiere a los carcinomas de cérvix se han detectado secuencias del HPV-16 y -18 en el caso de tumores más malignos y el HPV-6 y -8 en el caso de tumores menos agresivos.<sup>218,219,220</sup>

En los carcinomas de útero también se han determinado papilomavirus humanos y marcadores específicos de tejido como la endotelina R y la endopeptidasa.<sup>221</sup>

#### **g.Tumores neuroectodérmicos.**

Algunos de los marcadores utilizados en diferentes estudios, son: la amplificación de EGFR, las formas de CD44, la presencia de virus neurotróficos humanos, el virus JC, y las forma mutadas de *ras* y p53.<sup>222,223</sup>

En estudios sobre el neuroblastoma pediátrico, se han examinado la amplificación del oncogén *myc*, los marcadores específicos de tejido como la tirosinasa hidroxilada, CK-20 y la glicoproteína específica. El marcador clásico para neuroblastoma es la amplificación del *N-myc*.<sup>224</sup> El nivel de *N-myc* pronosticá de manera independiente una peor evolución, con independencia del estadio del cáncer.

#### **h.Sarcoma de Ewing.**

En el sarcoma de Ewing encontramos casi de manera patognomónica la translocación t(11;22), mientras que la detección del gen de fusión es altamente específica (100%) y sensible(100%).<sup>225,132</sup>

#### **i.Linfoma**

En los linfomas y leucemias encontramos reagrupaciones genéticas que pueden ser detectadas mediante la técnica de PCR con una elevada sensibilidad y especificidad.<sup>226</sup>

#### **j.Neuroblastoma**

En sangre periférica ,se puede detectar la tirosina hidroxilasa, que es una enzima que participa en la síntesis de catecolaminas y sirve como marcador de células de neuroblastoma.<sup>227</sup> También se ha utilizado el gen de la proteína neuroendocrina 9,5 (PGP 9.5)<sup>223</sup>.

Miyajima y cols<sup>227</sup>detectaron mediante la tirosina hidroxilasa, células de neuroblastoma en la sangre periférica y la médula ósea de pacientes

con estadios de I a III en el momento del diagnóstico, encontrando 18 de 38 pacientes positivos (47,3%) en médula ósea.

Mattano y cols<sup>223</sup> detectaron el gen de la PGP 9.5, en sangre periférica, en 8 de 18 pacientes (44,4%), con una capacidad de detección de 1 célula de neuroblastoma entre 10<sup>7</sup> células mononucleadas normales.

Norris y cols<sup>228</sup> publicaron la presencia de niveles de PGP 9.5 en el tejido hematopoyético normal, descartando dicho gen como marcador de células circulantes de neuroblastoma.

#### **k.Melanoma maligno cutáneo**

Existen numerosos trabajos publicados hasta la actualidad sobre pacientes afectos de melanoma maligno cutáneo en los que la molécula diana es el ARNm de la tirosinasa, citoqueratina-20, Mage-3, p97, muc-18, queratina-20, y la forma cáncer específica  $\beta$ -HCG. De todos estos, el ARNm de la tirosinasa es el marcador más estudiado puesto que en condiciones normales no encontramos la expresión de la tirosinasa en sangre periférica, siendo por lo tanto su presencia un marcador de melanocitos circulantes. De hecho la detección de la expresión del gen de la tirosinasa mediante PCR, fué en el año 1991, el trabajo pionero que demostró la posibilidad de detectar metástasis de tumores sólidos en la sangre periférica.<sup>123</sup> Muchos estudios posteriores han intentado valorar la utilidad de esta técnica con resultados variables.

A continuación se presentan los trabajos publicados según el estadio tumoral:

##### *\*Melanoma localizado (estadio I-III).*

El estadio de la enfermedad se ha correlacionado con el porcentaje de pacientes con evidencia de diseminación de células tumorales ocultas en varios<sup>123,164,165,231,233</sup> pero no en todos los trabajos publicados.<sup>232,237</sup> Según estos estudios, todas las series de pacientes son más bien pequeñas y encontramos diferencias en la selección de los mismos, que dificultan la comparación de resultados. Los primeros trabajos en sugerir que la prueba de la PCR presenta un valor pronóstico para el melanoma, han sido los publicados por dos grupos. Por un lado

Battayani y cols.<sup>164</sup> han publicado una recidiva significativamente superior durante los 4 primeros meses tras la resección de los nódulos linfáticos regionales metastásicos, en aquellos pacientes con una prueba positiva. Por otro lado el estudio prospectivo de Mellado y cols.<sup>233</sup>, demostró que la constatación de una transcripción de la tirosinasa en sangre periférica en pacientes en los estadios II y III, se asociaba con una reducción significativa de la supervivencia libre de enfermedad.

Estos resultados son similares a los observados con otros tumores sólidos.<sup>229</sup> En ninguno de estos trabajos se encontró la expresión de la tirosinasa en sangre periférica de los pacientes controles, lo cual sugiere una especificidad elevada. Actualmente no está claro el pronóstico para los pacientes, portadores de un melanoma maligno de úvea, con una prueba positiva mediante la RT-PCR para la tirosinasa en sangre periférica.

*\*Enfermedad avanzada (Estadio IV)*

Mediante la amplificación del ARNm de la tirosinasa<sup>123,231,233</sup> o utilizando un panel múltiple de marcadores PCR<sup>165</sup> varios grupos de investigación han encontrado mediante la PCR evidencia de células de melanoma circulantes en una elevada proporción de pacientes en estadio IV. Otros grupos han publicado una frecuencia considerablemente inferior para este grupo de pacientes.<sup>162,164,232,234</sup>

El porcentaje de pacientes en estadio IV con evidencia de células de melanoma circulantes en sangre periférica oscila entre el 0 al 100% (ver Tabla 3) y, de hecho las razones para esta diferencia no están claras. Dado que en todas las publicaciones la PCR era capaz de detectar una sola célula de melanoma en 10 ml de sangre, la diferente frecuencia de detección de células tumorales en las muestras clínicas probablemente reflejen diferencias en el procesado de las muestras o controles inadecuados.

Dos de los grupos que detectaron una frecuencia menor de células tumorales, publicaron que en el estadio IV, los pacientes con la prueba de PCR positiva, tenían una probabilidad superior a experimentar progresión de la enfermedad, respecto de los PCR negativos.<sup>162,164</sup>

En la mayoría de los pacientes en estadio IV y con remisión completa a largo plazo después de tratamiento con interferon- $\alpha$  e interleukina-2 con o sin resección de metástasis residuales, se ha encontrado ARNm de la tirosinasa en su sangre periférica.<sup>160</sup>

El análisis semicuantitativo mostró una concentración muy baja de transcritos de la tirosinasa en la sangre periférica de estos pacientes.<sup>161</sup>

Todavía no está claro si un incremento en la intensidad de la señal puede ser un indicador precoz de una recidiva, tal como sugieren algunos estudios.<sup>230</sup>

Tabla 3. Resumen de publicaciones en que se utiliza la PCR para la detección de micrometástasis en el melanoma maligno cutáneo

Diana	Tejido	Líneas cel.	Sensibilidad	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV	Total	n°control es	Publicación	ref.
<b>Tirosinasa</b>	SP	SK-mel 19,23,28, M-5	10cel/10cc				57%(4/7)		0%(0/8)	Smith,1991	123
<b>Tirosinasa</b>	SP			0%(0/4)	16.6%(1/6)	35,2%(6/17)	100%(29/29)	64,2%(36/56)	0%	Brossart,1993	231
<b>Tirosinasa</b>	SP						100%(28/28)	100%/28/28)	0%	Brossart,1994	160
<b>Tirosinasa</b>	SP	M-10/12/24/101 Mka,Mkn,Mke,Mst,Mmu	9lineas +/10 1cell/10 <sup>6</sup> -50 <sup>6</sup> PBL	42,8%(3/7)**	90,9%(10/11) **	85,7%(30/35) **	93,3%(62/66) **	59%(70/119)	0%(39)	Hoon,1995	165
<b>MAGE-3</b>	SP	M-10/12/24/101 Mka,Mkn,Mke,Mst,Mmu	8lineas +/10					10%(12/119)	0%(39)		
<b>p97</b>	SP	M-10/12/24/101 Mka,Mkn,Mke,Mst,Mmu	10lineas +/10					53,7%(64/119)	0%(39)		
<b>MUC-18</b>	SP	M-10/12/24/101 Mka,Mkn,Mke,Mst,Mmu	10lineas +/10					72,2%(86/119)	%(39)		
<b>Tirosinasa</b>	SP					8/18	50%(16/32)	27,9%(26/93)	0%	Battayani,1995	164
<b>Tirosinasa</b>	SP	SK-mel28, Colo38, Mevo, Mkr, MKrZ	10cel/10cc				100%(50/50)	100%(50/50)	0%	Brossart,1995	161
<b>Tirosinasa</b>	SP	VUP, SK-mel-19,23, FO- 1,2,5,6	1cell/ml				0%(0/6)			Foss,1995	232
<b>Tirosinasa</b>	SP	SK-mel28	1cel/10 <sup>6</sup> CelMo non.	23%(4/17)	45%(10/22)	40%(7/17)	33/35(94%)	59,3%(54/91)	0%(50)	Mellado,1996	233
<b>Tirosinasa</b>	SP						13%(3/24)	13%(3/24)		Pittman,1996	234
<b>Tirosinasa</b>	SP						18,7%(9/48)	14%(9/64)		Kunter,1996	162
<b>Tirosinasa</b>	SP			0%(42)	35%(7/20)	69%(23)		85	0%(20)	Tessier,1997	235
<b>Tirosinasa</b>	SP;GC		1cel/10 <sup>7</sup> PBL					59%(119)		Reintgen,1997	236
<b>p97</b>	SP		1cel/10 <sup>7</sup> PBL					56%			
<b>MUC-18</b>	SP		1cel/10 <sup>7</sup> PBL					72%			
<b>MAGE-3</b>	SP		1cel/10 <sup>7</sup> PBL					10%			
<b>Tirosinasa</b>	SP	SK-mel31	10cel/10cc	0%(0/10)	0%(0/21)	5%(1/21)	39%(5/13)	9,2%(6/65)	0%(20)	Reinhold,1997	237
<b>Tirosinasa</b>	SP	MAtt,M101,M10,12,14,24	6lineas+/6					86%(32)	0%(15)	Sarantou,1997	238
<b>TRP-1</b>	SP	MAtt,M101,M10,12,14,24	6lineas+/6					57%(20)	0%(15)		
<b>TRP-2</b>	SP	MAtt,M101,M10,12,14,24	6lineas+/6					74%(26)	0%(15)		
<b>Pmel 17</b>	SP	MAtt,M101,M10,12,14,24	6lineas+/6					86%(30)	0%(15)		
<b>MART-1</b>	SP	MAtt,M101,M10,12,14,24	6lineas+/6					83%(29)	0%(15)		
<b>Tirosinasa</b>	SP	Sk-Mel23,25,28, Wm- 1341,Ki-mel7,13,Ukrv- Mel4,8, BS 1251	1cel/cc 5lineas+/9	2,3%(1/43)	0%(0/15)		27,3%(12/44)	12,7%(13/102)	0%(35)	Gläser,1997	239

Diana	Tejido	Líneas cel.	Sensibilidad	Estadiol	Estadio II	Estadio III	Estadio IV	Total	n°control es	Publicación	ref.
<b>Tirosinasa</b>	SP	SK-mel 1	10cel/10cc				26%(13/50)			Jung,1997	240
	GC							26%(13/50)		Goydos,1998	241
<b>Tirosinasa, MART-1</b>	Gc							65,8%(52/79)	0%(46)	Blaheta,1998	242
	PB				17%(7/41)	44%(16/36)		23,5%(29/123)	0%	Farthmann,1998	243
<b>Tirosinasa</b>	PB	SK-mel-1						74%(37/50)	0%	Carrillo,1998	244
	PB	SK-mel-19	1cel/10 <sup>5</sup> PBMC		12.5%(2/16)	15%(6/40)	6%(1/17)	12%(9/73)	0%(25)	Ghossein,1998	199
<b>Tirosinasa</b>	BM	SK-mel-19	1cel/10 <sup>5</sup> PBMC		25%(4/16)	18%(11/62)	10%(3/31)	16.5%(18/109)	0%(25)		
	PB	MM200,Mel-FC	1cel/10 <sup>6</sup> PBMC	12%(4/31)	23%(30/129)	34%(39/116)			0%(50)	Curry,1998	245
<b>Tirosinasa MART-1</b>	PB	MM200,Mel-FC	1cel/10 <sup>6</sup> PBMC	0%	15%	13%			0%		
	PB	MM200,Mel-FC	1cel/10 <sup>6</sup> PBMC						Falsos+		
<b>p97 MUC-18 gp100</b>	PB	MM200,Mel-FC	1cel/10 <sup>6</sup> PBMC						Falsos+		
	PB	MM200,Mel-FC	1cel/10 <sup>6</sup> PBMC						Falsos+		
<b>Tirosinasa</b>	GC							61,4%(70/114)		Shivers,1998	246
	SP	M12,M101,B231	1cel/10 <sup>7</sup> cel ca.mama					43,7%(7/16)	0/5	O'Connell,1998	247
<b>Tirosinasa</b>	SP							5.5%(2/36)		Sardi,1999	248
	SP				10%(1/10)	20%(4/20)		16.6%(5/30)		Le Bricon,1999	249
<b>Tirosinasa MIA</b>	GC							73%(19/26)	11%(2/18)	Bieligk,1999	250
	SP									Muhlbauer,1999	
<b>Tirosinasa</b>	SP							35%(7/20)		Waldmann,1999	251
	BM							35%(7/20)			

\*TRP 1,2. Tyrosinase-related protein es \*\*Pacientes PCR + teniendo en cuenta 4 marcadores p97, tirosinasa, MAGE-3, MUC18

## **I. Melanoma maligno de úvea**

Hasta la fecha sólo hay publicados tres estudios de la utilización de la RT-PCR para determinar melanocitos circulantes en el melanoma maligno de úvea (ver Tabla 4); El primero de ellos publicado por Tobal y cols en 1993,<sup>252</sup> es un estudio piloto con seis pacientes afectos de melanoma maligno de úvea, dos de los cuales presentaban enfermedad metastásica. De los seis pacientes, tres fueron positivos a la RT-PCR para la tirosinasa, siendo positivos los dos pacientes que presentaban metastásis diagnosticada, y el tercero la desarrolló a los 9 meses de la extracción de sangre. El segundo estudio fué publicado en 1995 por Foss<sup>232</sup>, perteneciente al mismo grupo de investigadores, y se tomaron 51 muestras de 36 pacientes afectos de melanoma de úvea, así como 6 muestras de seis pacientes afectos de melanoma maligno cutáneo en estado metastásico. No se consiguieron positivos a la RT-PCR para la tirosinasa, excepto en un paciente control y en otro con una lesión sospechosa de nevus coroideo. Los autores atribuyeron el origen de este falso positivo a una contaminación de las muestras por melanocitos cutáneos y concluyeron su trabajo con la afirmación de que la RT-PCR para la tirosinasa, no es clínicamente útil para la determinación de enfermedad metastásica. Según los autores el número de células circulantes en sangre periférica es inferior al esperado, debido al proceso de filtrado experimentado por los melanocitos a nivel pulmonar y de los capilares periféricos, antes de llegar al sistema venoso periférico.

El tercer trabajo publicado es el de Yosuf El-Shabrawi en 1998<sup>253</sup> en el que se estudiaba el suero de 12 pacientes afectos de melanoma maligno de úvea sin evidencia de metástasis en el momento de la extracción, de los cuales 2 (16,6%) fueron positivos a la RT-PCT para la tirosinasa.

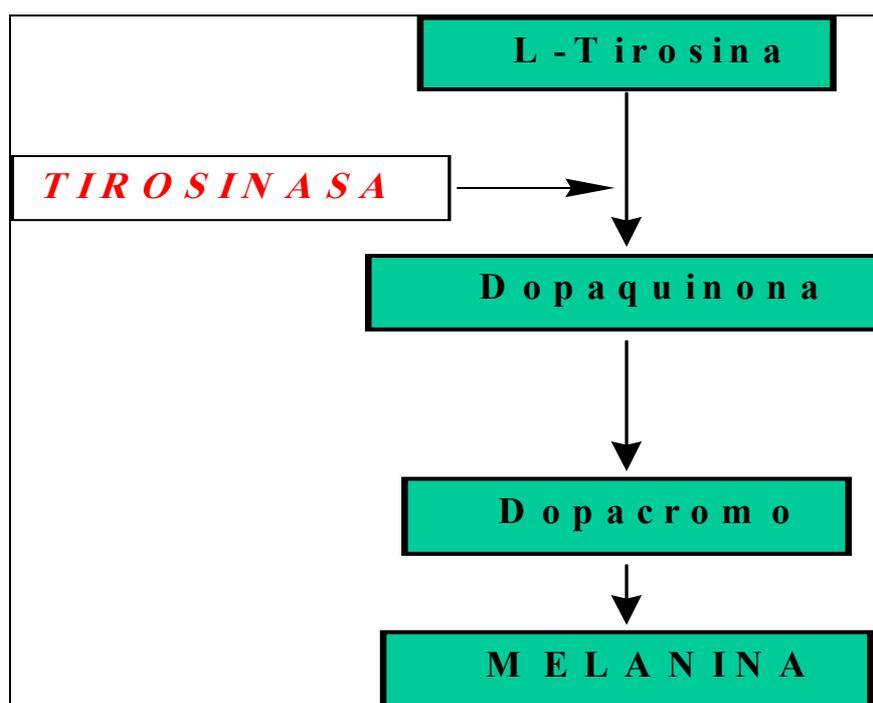
Tabla 4. Utilización de la PCR en el diagnóstico del melanoma maligno de úvea

<b>Diana</b>	<b>Tejido</b>	<b>Líneas cel.</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Estadio I</b>	<b>Estadio II</b>	<b>Estadio III</b>	<b>Estadio IV</b>	<b>Total</b>	<b>n° controls</b>	<b>Publicación</b>	<b>n°ref.</b>
<b>Tirosinasa</b>	SP	VUP	10cel/5ml				2/2	50%(3/6)		Tobal,1993	252
<b>Tirosinasa</b>	SP	VUP, SK-mel-19,23, FO-1,2,5,6	1cell/ml					0%(0/36)		Foss,1995	232
<b>Tirosinasa</b>	SP							16,6%(2/12)		El-Shabrawi,1998	253

## 2.6. MELANINA, MELANOGENESIS

La melanina es el principal pigmento presente en las estructuras superficiales de los vertebrados y es predominantemente un polímero indólico. La biogénesis de melanina en animales tiene lugar por un proceso de oxidación que se inicia con el aminoácido L-tirosina. El paso principal de este proceso es la oxidación de la tirosina en dopaquinona mediante la enzima tirosinasa. Los siguientes pasos son las sucesivas transformaciones de la dopaquinona en dopacromo y finalmente este, en melanina, tal como se refleja en la Fig. 2

Fig. 2. Esquema de la síntesis de melanina



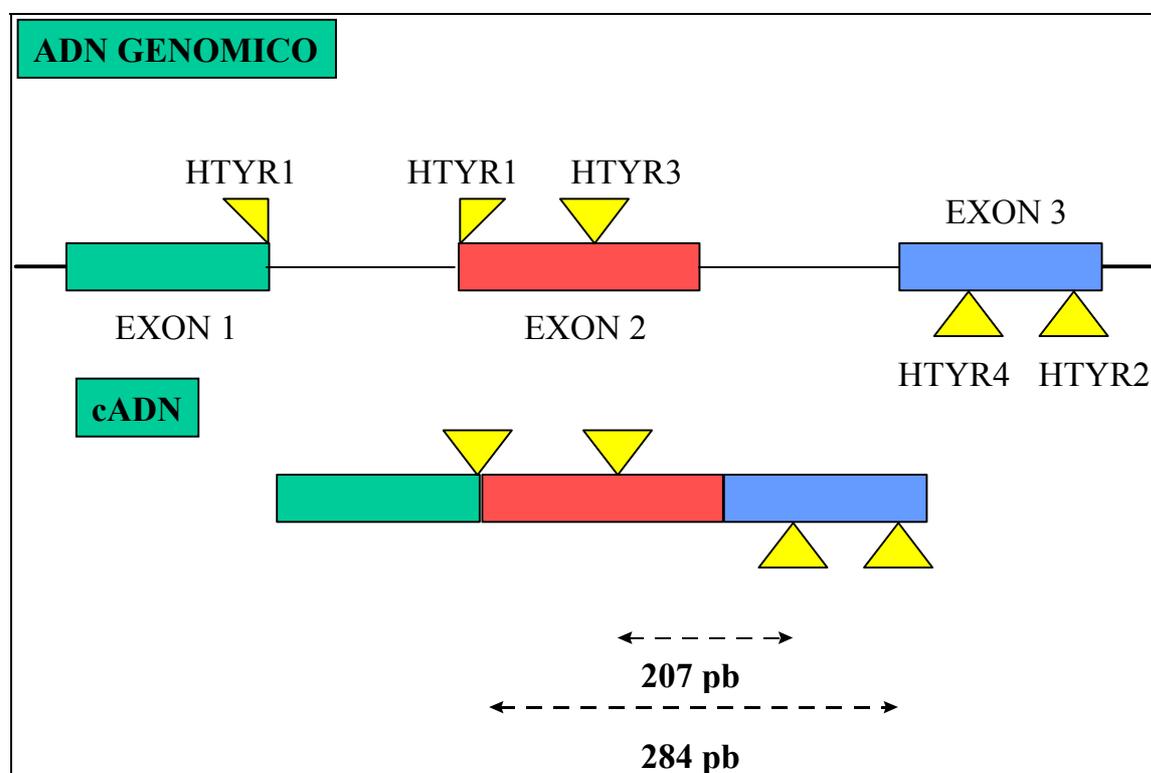
En los vertebrados estas reacciones tienen lugar a nivel de las organelas especializadas ligadas a las membranas (melanosomas). Actualmente se cree que el grupo de las enzimas melanogénicas está presente como un complejo asociado a una matriz proteica<sup>254</sup>, y todo ello se encuentra bajo el control de un promotor de la tirosinasa. Este promotor sólo se activa en células melanogénicas especializadas<sup>255</sup>, es decir, en las células del epitelio

pigmentario de la retina y en las células dentríticas derivadas de la cresta neural, conocidas como melanocitos.

Los melanocitos están ampliamente distribuidos por el cuerpo y son los responsables de la pigmentación de las estructuras superficiales. En los mamíferos los gránulos de melanina se distribuyen por la epidermis y por el cabello gracias a un proceso denominado de transferencia citocrina, según el cual fragmentos del citoplasma de los melanocitos (los extremos de los procesos dentríticos), son absorbidos mediante endocitosis por las células epiteliales.

En la actualidad, conocemos la organización genómica de la tirosinasa y la secuencia de ADNc y además disponemos de cebadores para su amplificación. El gen de la tirosinasa contiene varios intrones, de modo que para la amplificación del ADN por la PCR se han seleccionado “primers” representados en diferentes exones del gen,<sup>256</sup> tal como se refleja en la Fig. 3.

Fig. 3. Diagrama esquemático del ADN genómico y localización de los cebadores.



### **3. OBJETIVOS**



Los objetivos de este estudio son:

1. Valorar la sensibilidad de la PCR con transcripción reversa para detectar ARNm del gen de la tirosinasa producido por células de melanoma maligno de úvea en sangre periférica, a partir de varias líneas celulares.
2. Valorar en que proporción de pacientes diagnosticados de melanoma maligno de úvea se detecta ARN mensajero del gen de la tirosinasa mediante la técnica del RT-PCR en sangre periférica
3. Relacionar los métodos actuales para el escrutinio sistémico en pacientes afectos de melanoma de úvea (radiografía de tórax, enzimas hepáticas, ecografía hepática), con la determinación de ARNm de la tirosinasa mediante la técnica de RT-PCR.
4. Relacionar factores pronósticos conocidos, clínicos y anatómopatológicos, en el melanoma maligno de úvea, con el resultado de la PCR con transcripción reversa



## 4. MATERIAL Y METODOS



#### **4.1. LINEAS CELULARES:**

En este estudio hemos utilizado las siguientes líneas celulares:

1. Melanoma maligno cutáneo.

**Línea SK-Mel 28** (American Type Culture Collection, Manassas ,VA).

Como control positivo en la aplicación de la RT-PCR en las muestras de los pacientes afectos de melanoma.

2. Melanoma maligno uveal.

**Líneas 92-1, SP6.5, SP8.0 y TP31.** Para la realización de los estudios de sensibilidad de la RT-PCR y también se han utilizado como control positivo.

La línea celular 92-1 ha sido cedida por el Dr. I. de Waard-Siebinga y por la Dra. MJ. Jager, del departamento de Oftalmología del Hospital Universitario de Leiden en Holanda.<sup>257</sup>

Las líneas celulares SP6.5, SP8.0 y TP31, fueron cedidas por el Dr. Guy Pelletier del Centre de Recherche Pav. CHUL en Canada.

Las líneas celulares 92.1 y SP6.5 se obtuvieron indirectamente a través del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), de Valladolid, y a través de los Dres. A. Saornil y A. Morilla, tras obtener el permiso expreso de utilización de sus propietarios.



#### **4.2. CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES DE MELANOMA MALIGNO DE UVEA Y VALORACION DE LA SENSIBILIDAD.**

Las células de las líneas 92-1 y SP6.5, se cultivaron en un medio de cultivo RPMI1640 con un 10% de suero bovino fetal y glutamina 2 mM, y las células de las líneas SP8.0 y TP31 se cultivaron en un medio de cultivo DMEM con un 10% de suero bovino fetal y glutamina 2mM. Todas ellas a temperatura de 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Se congelaron diferentes alícuotas para la posterior extracción de ARN y tras extraer el ARN de estas células, se realizó la técnica de RT-PCR, tal como se describe más adelante, utilizando los cebadores que codifican la tirosinasa, y llevando a cabo estudios de sensibilidad.

De la línea celular SP6.5 no fué posible obtener un suficiente número de células para su posterior procesamiento, por lo que dicha línea se descartó.

Para los estudios de sensibilidad se hicieron diluciones de células mononucleadas normales con células de las diferentes líneas celulares, a una concentración total de 10 millones de células. Las diluciones que se realizaron fueron, las que se detallan en la Tabla 5.

Nºcélulas línea celular	Nº Células normales	Concentración (células tumorales/células totales)
1	10.10 <sup>6</sup>	10 <sup>-7</sup>
10	10.10 <sup>6</sup>	10 <sup>-6</sup>
100	9999.9.10 <sup>3</sup>	10 <sup>-5</sup>
1000	999.9.10 <sup>4</sup>	10 <sup>-4</sup>
10000	99.9.10 <sup>5</sup>	10 <sup>-3</sup>
100000	9.9.10 <sup>6</sup>	10 <sup>-2</sup>
1.10 <sup>6</sup>	9.10 <sup>6</sup>	10 <sup>-1</sup>
10.10 <sup>6</sup>	-	1

Tabla 5. Diluciones de las líneas celulares



### **4.3. SELECCIÓN DE PACIENTES**

Se hizo una revisión de todos los pacientes diagnosticados y tratados por un melanoma maligno de úvea en el Servicio de Oftalmología de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge desde noviembre de 1988 hasta noviembre de 1998.

Los criterios de inclusión fueron.

- a) Pacientes con el diagnóstico clínico de melanoma maligno de úvea en cualquier estadio clínico, con independencia del tratamiento recibido por el mismo.
- b) Cuando no existía estudio patológico confirmatorio del diagnóstico, se consideró como criterio válido la exploración clínica positiva (fondo ojo, ecografía, angiografía fluoresceínica, resonancia magnética nuclear)
- c) Aceptación expresa de participar en el estudio tras explicar detalladamente a los pacientes la naturaleza y los objetivos del mismo.

Los criterios de exclusión fueron:

- a) Negativa por parte del paciente o familiares a colaborar en el estudio.
- b) La presencia de otra neoplasia maligna, no se consideró como criterio de exclusión.

En general estos pacientes llegaron al servicio de Oftalmología de la CSUB por dos vías:

- a) Remitidos por otros oftalmólogos con la sospecha diagnóstica de melanoma maligno de úvea.
- b) Acudieron de Urgencias a nuestro hospital por trastornos visuales diversos.

A todos ellos se les realizó una exploración oftalmológica completa, que incluía:

1. Agudeza visual. Optotipos de Snellen

2. Biomicroscopía con lampara de hendidura
3. Tonometría
4. Fondo del ojo con oftalmoscopio indirecto, lente de contacto tipo Goldman o bien con lentes oftalmoscópicas de no contacto (de +90 o +78D)
5. Ecografía ocular en modos A y B.

En aquellos casos en que persistían dudas diagnósticas, tras esta exploración, se les practicó una Resonancia Nuclear Magnética.

Una vez confirmado el diagnóstico, estos pacientes fueron valorados por el departamento de Oncología Médica o Radioterápica, practicándose en la primera visita:

1. Exploración física completa
2. Analíticas generales.
  - Hemograma completo
  - Bioquímica completa
  - Marcadores hepáticos (GOT, GPT, Gamma-GT, Fosfatasa alcalina, LDH)
3. Radiografía de tórax.
4. Ecografía hepática.

Una vez confirmada la no existencia de enfermedad diseminada, se procedió al tratamiento más adecuado, individualizado según la localización y el tamaño tumoral. La elección del tratamiento también dependió de la disponibilidad de terapéuticas más novedosas en el momento del diagnóstico (p.e. braquiterapia oftálmica, radioterapia externa con protones acelerados) y de la opinión del propio paciente, una vez explicadas las alternativas terapéuticas.

El tratamiento quirúrgico de estos pacientes se llevó a cabo en el Servicio de Oftalmología de la CSUB, exceptuando:

1. Los tratamientos mediante placas radioactivas de Iodo-125 (braquiterapia oftálmica), aplicados a 31 pacientes, que se realizaron conjuntamente entre el Servicio de Oftalmología del Hospital de

Bellvitge y el Servicio de Oncología Radioterápica del Institut Català d'Oncologia, todos ellos pertenecientes a la CSUB.

2. Los tratamientos con protones acelerados, aplicados a 4 pacientes, que se realizaron por el Dr.L. Zografos en el Hospital Jules Gonin en Lausanne (Suiza), puesto que en nuestro país no hay disponibilidad de un ciclotrón.
3. Un paciente, a petición propia; fué tratado por el doctor B.E.Damato en Liverpool (UK), practicándosele una resección local de su tumoración bajo hipotensión controlada.
4. Otro paciente, a petición propia, fué tratada por el doctor J.D. Grange en Lyon (Francia), practicándosele una resección local de su tumoración. En el postoperatorio inmediato se le diagnosticó una oftalmopatía simpática, por lo que el mismo doctor le realizó una enucleación del globo ocular.

Disponemos de material para el estudio anátomo-patológico en el grupo de pacientes en que se les practicó, una enucleación del globo ocular, una exéresis de la tumoración, o bien una endorresección, exepuando aquellos pacientes que fueron tratados en el extranjero.



#### **4.4. DATOS REGISTRADOS EN LOS PACIENTES EVALUADOS**

##### **4.4.1. DATOS CLÍNICOS**

- Edad
- Sexo
- Ojo afecto
- Agudeza visual. Valorada mediante optotipos de Snellen

##### **4.4.2. DATOS RELACIONADOS CON EL TUMOR**

- Origen tumoral. Se diferenciaron tres categorías: iris, cuerpo ciliar y coroides
- Localización. Según la localización del centro del tumor. Se distinguieron: polo posterior, temporal superior, temporal medio, temporal inferior, inferior, nasal inferior, nasal medio, nasal superior, superior.
- Localización sagital. Se diferenciaron tres categorías: superior, horizontal e inferior. Se consideró un tumor sagital cuando el “centro de gravedad” de la tumoración estaba localizado en el meridiano horizontal que pasa a través de la fovea; siendo superior o inferior si el tumor se situaba por encima o por debajo de esta línea.
- Localización coronal. Se distinguieron tres categorías: nasal, vertical y temporal. Se consideró un tumor vertical cuando el “centro de gravedad” de la tumoración estaba localizado en el meridiano vertical que pasa a través de la fovea; siendo nasal o temporal si el tumor se situaba medial o lateral a la fovea.
- Margen tumoral anterior. Se diferenció entre: preecuatorial y retroecuatorial, respecto al ecuador del globo ocular.
- Margen tumoral posterior. Se diferenció igualmente entre: preecuatorial y retroecuatorial, respecto al ecuador del globo ocular.

- Extensión. Se registró la invasión clínica de la esclerótica y la del humor vítreo.
- Presencia de catarata
- Presencia de glaucoma
- Presencia de rotura de la membrana de Bruch
- Presencia de desprendimiento de retina y el porcentaje de afectación.
- Estadaje del tumor según la clasificación del COMS. Se diferenciaron tres categorías, según la Tabla 6.

TAMAÑO TUMORAL	
<b>Estadio I</b>	Tumores de < 3 mm en altura y < 10 mm en diámetro máximo
<b>Estadio II</b>	Tumores entre 3 y 10 mm en altura y/o diámetro máximo entre 10 y 15 mm
<b>Estadio III</b>	Tumores de > 10 mm en altura o diámetro máximo >15mm.

Tabla 6. Clasificación tumoral según el COMS

- Afectación del disco óptico y su extensión en franjas horarias
- Afectación del cuerpo ciliar y su extensión en franjas horarias
- Afectación del iris y su extensión en franjas horarias
- Afectación del limbo y su extensión en franjas horarias
- Altura de la lesión. Medida mediante ecografía en modo A, gracias a un vector perpendicular a la tumoración, que atraviese el vértice tumoral.
- Base tumoral horizontal. Medición de la cuerda máxima entre los dos márgenes tumorales, realizada sobre una proyección horizontal de la tumoración mediante ecografía en modo B.
- Base tumoral vertical. Medición de la cuerda máxima entre los dos márgenes tumorales, realizada sobre una proyección vertical de la tumoración mediante una ecografía en modo B.
- Distancia en mm. al disco óptico
- Distancia en mm. a la fovea

#### 4.4.3.DATOS RELACIONADOS CON LA ANATOMIA PATOLOGICA

- Porcentaje de células fusiformes.
- Porcentaje de células epitelioides.
- Tipo celular. Se diferenciaron tres categorías: fusiforme, epiteliode y mixto.
- Número de mitosis. Número de mitosis en 50 campos a gran aumento (x40).
- Porcentaje de necrosis.
- Grado de inflamación.
- Grado de pleomorfismo.
- Número de células positivas para PCNA. En 50 campos a gran aumento (x40).
- Infiltración total de la esclerótica.
- Infiltración parcial de la esclerótica.
- Infiltración de la epiesclera.
- Infiltración de las venas vorticosas.
- Invasión de la malla trabécular.
- Invasión del canal de Schlemm.
- Invasión del iris.
- Invasión del cuerpo ciliar.
- Invasión de la retina.
- Invasión del humor vítreo.
- Rotura de la membrana de Bruch.
- Presencia de implantes prerretinianos.

#### 4.4.4. DATOS RELACIONADOS CON LA CIRUGIA

- Tipo de tratamiento aplicado a cada paciente.
- Enucleación del globo ocular, fotocoagulación con láser, exéresis transescleral, braquiterapia con Iodo-125, radioterapia externa con protones acelerados, endorrección, exenteración orbitaria.
- Diferenciación en 2 categorías:
  - Tratamiento no conservador. Enucleación o exenteración orbitaria.

- Tratamiento conservador. Resto de tratamientos.

#### 4.4.5. ESTADO SISTEMICO

Se valoró el estado sistémico en dos categorías:

1. Pacientes sin evidencia clínica de enfermedad sistémica diseminada.
2. Pacientes con evidencia clínica de enfermedad sistémica diseminada.

Tal como está previsto todos estos pacientes, se visitaron a intervalos de 6 meses, en los servicios de Oftalmología, Oncología médica u Oncología radioterápica de la CSUB. En cada visita se realizaba anamnesis, exploración física y análisis general en que se incluían hemograma, bioquímica y marcadores hepáticos (GOT;GPT; FA;LDH; Gamma-GT). Se practicaron radiografía simple de tórax y ecografía hepática, con una periodicidad aproximadamente anual para ambas. La gammagrafía ósea y la TAC toraco-abdominal se reservaron para los casos de duda diagnóstica sobre la afectación sistémica. Este estudio general completo lo hemos considerado como la prueba diagnóstica estándar o *gold standard* de cara a la detección clínica de metástasis.

Para valorar el estado sistémico de estos pacientes se han revisado las historias clínicas de todos los que cumplían los criterios de inclusión. Si no se evidenciaba afectación sistémica en un intervalo de 4 meses antes y después de la toma de la muestra sanguínea, se catalogaba como ausencia de enfermedad metastásica. En cambio, si se evidenciaban metástasis en el mismo intervalo de tiempo, entonces se catalogaba como presencia de enfermedad metastásica.

#### 4.4.6. DATOS EVOLUTIVOS

- Días desde el diagnóstico hasta la extracción sanguínea
- Días desde el diagnóstico hasta la aparición de las metástasis.

## **4.5. CONTROLES**

### **4.5.1. CONTROL NEGATIVO**

Se han utilizado las muestras sanguíneas de 35 individuos afectados de síndromes mieloproliferativos crónicos (Leucemia mieloide crónica, policitemia vera o trombocitosis esencial) sin evidencia de la presencia de melanoma de úvea y las muestras sanguíneas de 6 pacientes sanos.

### **4.5.2. CONTROL POSITIVO**

El control positivo fué la línea celular SK-Mel 28.



#### 4.6. TECNICA DE RT-PCR

Todos los pacientes que cumplían los criterios de inclusión han seguido el siguiente protocolo, que comprende varios pasos y que quedan resumidos en la Fig.4 :

- 1.Extracción sanguínea
- 2.Separación de las células mononucleares. Gradiente Ficoll
- 3.Extracción del ARN.
- 4.Comprobación de la integridad del ARN
- 5.Retrotranscripción (RT)
- 6.Integridad de ADNc.Gen ABL
- 7.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- 8.Visualización en gel de Agarosa.

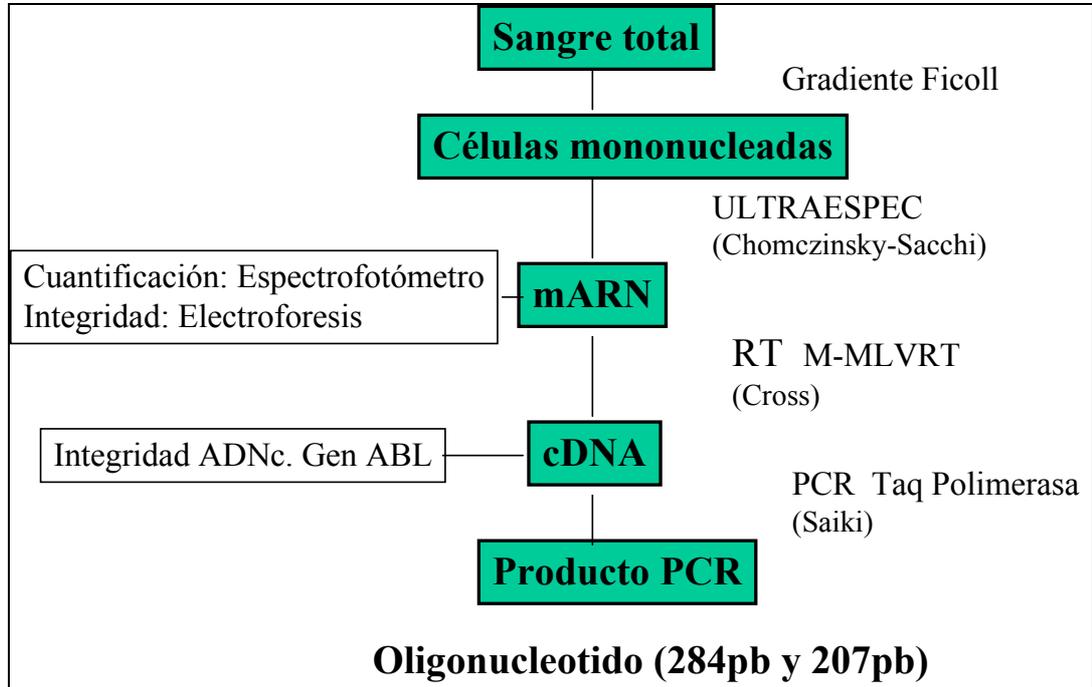


Fig. 4. Esquema general del proceso de la RT-PCR

#### 4.6.1. EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

A cada paciente se le extrajeron 10 ml de sangre en un tubo de 10cc con EDTA, descartándose los 3 primeros ml mediante otro tubo de 3 cc, todo ello con el sistema VENOCAT<sup>®</sup>. La muestra se conservaba a temperatura ambiente cuando se procesaba al momento, o bien se guardaba en nevera a 4°C en caso contrario.

#### 4.6.2. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES

La separación de células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante un gradiente de Ficoll según la técnica descrita por Boyun<sup>258</sup> y esquematizada en la

Fig. 5

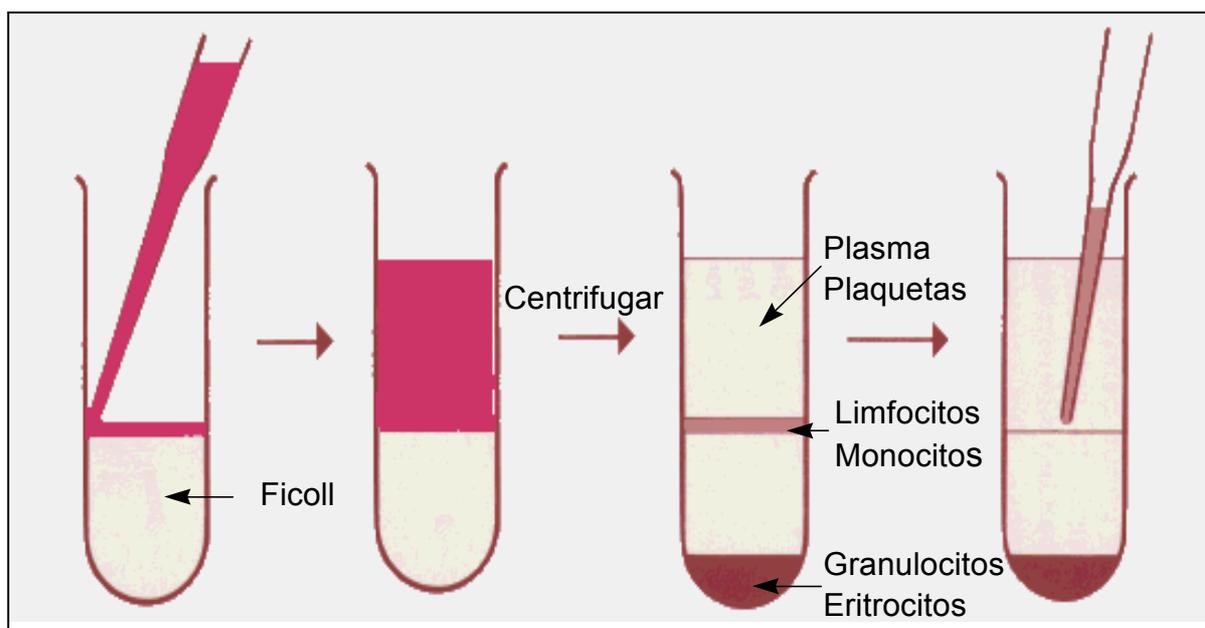


Fig. 5. Diagrama esquemático de la técnica de separación celular mediante gradiente de Ficoll.

- Colocamos 2,5 ml de una solución de Ficoll (Seromed<sup>®</sup>; densidad = 1.077 g/cm<sup>3</sup>) a temperatura ambiente, en un tubo Falcon de 15 ml correctamente rotulado. Hacíamos lo mismo para todas las muestras para procesar.

- Con una pipeta Pasteur de plástico añadimos 5 ml de sangre sobre la solución de Ficoll (proporción de 2 volúmenes de sangre por un volumen de solución de Ficoll), teniendo cuidado en no mezclar ambas fases. Es conveniente apoyar la pipeta sobre la pared del tubo y añadir la sangre con suavidad. Como dispusimos de 10 ml de sangre los partimos en dos tubos.
- Antes de dejar que los eritrocitos sedimentasen se pusieron los tubos en la centrifugadora: Temperatura(T)=25°C, tiempo(t)=25 min. y aceleración( $a_c$ ) = 1000g (2000 rpm).
- Al sacar los tubos de la centrífuga observamos, de abajo a arriba del tubo, la siguiente distribución:
  - I. Sedimento de hematies y polinucleares
  - II. Solución de Ficoll
  - III. Anillo de células mononucleares (PBMC)
  - IV. Plasma sanguíneo

Aspiramos el anillo de células mononucleares con una pipeta Pasteur de plástico y lo pasamos a otro tubo falcon, teniendo especial precaución de no aspirar la solución de Ficoll. Como tenemos dos tubos por muestra, ponemos los dos anillos de cada una en un mismo tubo.

- Se acabaron de completar los tubos con PBS-1X a temperatura ambiente. Tapamos los tubos y los mezclamos.
- Centrifugamos a 25°C(temperatura ambiente) durante 7 minutos a 1200 g (2300 rpm).
- Decantamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet con PBS 1X con una pipeta Pasteur de plástico.
- Repetimos la centrifugación en las mismas condiciones previas.
- Decantamos el sobrenadante y resuspendimos con 2 ml de PBS 1X. Con la misma Pasteur usada en la resuspensión pasamos 1 ml a cada uno de dos tubos eppendorf estériles, previamente rotulados con el nombre del paciente y la fecha de la separación (si el pellet provenía de sólo 5 ml de sangre entonces resuspendemos con 1 ml de PBS y lo pasamos a un sólo eppendorff).

- Centrifugamos los eppendorf 3 minutos a 13000 rpm y a temperatura ambiente.
- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet con 1 ml de la solución Ultraspec<sup>®</sup> (Biotek laboratories inc), mediante el uso de una jeringa estéril. Hacer 8-10 pasadas hasta que el pelet esté totalmente resuspendido. Uno de los dos tubos lo podemos dejar sin resuspender.
- Congelar los eppendorf a -80°C hasta el momento de extraer el ARN.

Para la extracción de ARN era necesario disponer de por lo menos 5 millones de células.

#### 4.6.3. EXTRACCIÓN DE ARN

A diferencia de la separación de mononucleares que debe realizarse el mismo día de la obtención de la muestra de sangre, la extracción de ARN puede postponerse siempre que las células estén congeladas a -80° C.

La extracción de ARN se realizó mediante un Kit comercial denominado Ultraspec<sup>®</sup> siguiendo el protocolo recomendado. El método de extracción se basó en la técnica descrita por Chomczynsky y Sacchi en 1987<sup>259</sup>, que consiste en una lisis de las células mediante sales de guanidina 14 M y urea. El ARN se degrada fácilmente por lo que debe manejarse siempre en hielo y conservarse a -80° C.

El protocolo que seguimos es el siguiente:

- Descongelamos los tubos resuspendidos en Ultraespec<sup>®</sup> y los guardamos a -80° C. Las células se resuspendieron pasando unas 15-20 veces por una jeringa de 2 ml con una aguja de 20 G. Si la solución era muy viscosa se añadió un poco más de Ultraspec<sup>®</sup>.
- Se dejó como mínimo 5 minutos a 4° C, para permitir la completa disociación de los complejos proteínas-ácidos nucleicos.
- Se añadieron 200 µL de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) por cada ml de Ultraspec<sup>®</sup>. Es necesario usar puntas con filtro o tirar el cloroformo a distancia, evitando que las puntas contactasen con los tubos. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se dejó nuevamente en hielo durante 5 minutos.

- Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos y a 4° C ( en la cámara fría) formándose 2 fases. En la fase inferior quedaron el ADN y las proteínas, y en la fase superior acuosa, el ARN.
- Se transfirió con mucho cuidado la fase acuosa a un nuevo eppendorff estéril. Es importante no llevarse nada de la fase inferior, ni de la interfase. Son necesarias puntas con filtro o si bien no es posible, debemos ir con la máxima precaución para evitar contaminaciones cruzadas entre muestras. Anotamos el volumen final transferido para cada muestra.
- Se añadió un volumen igual de 2-propanol ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ) a la fase acuosa previamente obtenida. Mezclamos por inversión hasta una homogeneidad total y se dejó que precipitase el ARN a 4° C por un periodo mínimo de 10 minutos.
- Se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos, a 4° C, y se observó el ARN como un pequeño precipitado blanco en el fondo del eppendorff.
- Se eliminó el sobrenadante por decantación y se hicieron 2 lavados con etanol al 75% preparado con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC (Dietilpirocarbonato, inhibidor de ribonucleasas) a 10.000 rpm durante 5 minutos y a 4° C.
- El precipitado blanco se dejó secar como mínimo durante 30 minutos, poniéndose los tubos boca abajo sobre un papel Kleenex.
- Cuando el ARN estaba completamente seco se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC y se dejó que se resuspendiese el ARN a 4° C un mínimo de 30 minutos. La resuspensión se efectuó con una pipeta y después los tubos se dejaron 30-60 minutos en hielo.

#### 4.6.4. ANÁLISIS E INTEGRIDAD DEL ARN

##### **Concentración del ARN**

Una vez extraído el ARN, se leyó su concentración en un espectrofotómetro. Para ello se prepararon un tubo eppendorf, que era el blanco, con 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC, y un tubo eppendorf para cada muestra con 396  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC y 4  $\mu\text{L}$  de ARN. Se leyó la concentración a 260 y a 280nm. A 260 nm leímos la concentración de los ácidos nucleicos y a 280 nm la de las proteínas. La

concentración de ARN se calculó partiendo de la base de que 1 DO=40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN. Como se había llevado a cabo una dilución de 1/100, el cálculo a realizar fué:

$\text{DO}_{260\text{nm}} \times \text{factor de dilución (400/4)} \times 40 =$	$\mu\text{L}/\text{mL}$
---	-------------------------

El cociente entre 260/280 debía oscilar entre 1,5 y 2,1 para considerar que el ARN estaba en buenas condiciones. Una vez leído el ARN se rotuló el eppendorf con el nombre de la paciente, la fecha y la concentración de ARN, y se guardó a  $-80^\circ \text{C}$ .

### **Integridad del ARN**

Para comprobar la integridad de ARN se llevó a cabo la visualización de 1  $\mu\text{g}$  de ARN en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Si aparecía 2 bandas (18S y 28S), podíamos afirmar que el ARN estaba en buenas condiciones. Este era un punto importante, pues si el resultado de la PCR era negativo, debíamos asegurarnos de que la causa no fuera un ARN degradado, lo cual correspondería a un falso negativo. El protocolo es el siguiente:

- añadir 1  $\mu\text{g}$  de ARN por muestra en un eppendorf y añadir agua-DEPC hasta 10  $\mu\text{l}$ . Posteriormente añadir 2  $\mu\text{l}$  del tampón de carga de 6x
- Correr en gel de Agarosa 1% utilizando TBE 0,5 X como tampón.

#### **4.6.5. RETROTRANSCRIPCIÓN.**

Consiste en la formación de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mediante la utilización de hexámeros al azar.<sup>260</sup>

- Para ello se partió de 1  $\mu\text{g}$  de ARN en un volumen total de 19  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC.
- El ARN se desnaturalizó durante 5 minutos a  $65^\circ \text{C}$  y se puso inmediatamente en hielo.
- Seguidamente se mezclaron los 19  $\mu\text{L}$  de ARN desnaturalizados con 21  $\mu\text{L}$  de la solución de ADNc, a la que se añadió M-MLVRT (2U/ $\mu\text{L}$ ) GIBCO y ARNsin (0,004U/ $\mu\text{L}$ ) PROMEGA

- A continuación se incubó sucesivamente a 37° C durante 1 hora y a 65° C durante 10 minutos para la desnaturalización de la enzima.
- El ADN<sub>c</sub> así obtenido podía utilizarse para la técnica de PCR o bien guardarse congelado a -20°.

#### 4.6.6. INTEGRIDAD DE ADN<sub>c</sub>. GEN ABL.

Para comprobar que la RT había sido correcta, y de forma indirecta conocer la integridad del ARN utilizado, se amplificó una secuencia del gen ABL, presente en todas las células del organismo. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos A2 y CA3 correspondientes al gen ABL según la técnica descrita por Cross<sup>260</sup>.

- Se mezcló 1 µL de ADN<sub>c</sub> con 19 µL de una mezcla que contiene 10 mM Tris pH 8,3; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 0,5 µM de los oligonucleótidos A2 y CA3; 0,25 mM de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGPT) y 1,5 U de Taq polimerasa.
- La reacción de amplificación consistió en un ciclo de 20 segundos a 96° C, seguidos de 2 minutos a 69° y 2 minutos a 73°.
- Posteriormente se realizaron 30 ciclos de 15 segundos a 97°C, de 50 segundos a 64° y de 50 segundos a 73°.
- Se procedió a una etapa de extensión de 10 minutos a 73°.
- El producto de la reacción se visualizó en un gel de agarosa el 2 %, observándose una banda de 284 bp.

La secuencia de los cebadores es:

A2: 5'TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T 3'

CA: 5'TGT TGA CTG GGCG TGA TGT AGT TGC TTG G3'

#### 4.6.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Saiki<sup>119</sup>, permite la amplificación *in vitro* de una secuencia conocida de ADN mediante la utilización de dos oligonucleótidos que son complementarios a

cada uno de los extremos del fragmento a amplificar, y que actúan como cebadores de la reacción, de forma que, la región que se amplifica es la situada entre ambos. Además de los cebadores y del ADN molde, en la reacción de PCR se deben incluir una mezcla de nucleótidos, que permitan sintetizar las nuevas cadenas de ADN, un tampón de la reacción con una concentración de magnesio adecuada y por último, el enzima taq polimerasa. Esta enzima se caracteriza por catalizar la incorporación de los nucleótidos a partir de los oligonucleótidos cebadores, y mantener su actividad aunque se someta a altas temperaturas.

La reacción de PCR se desarrolla básicamente en tres etapas:

1. Etapa de desnaturalización del ADN, que tiene lugar entre 94-98° C
2. Etapa de hibridación de los cebadores a las secuencias complementarias de ADN, que tiene lugar a una temperatura de 50 a 72° dependiendo de las secuencias de los cebadores
3. Etapa de extensión, en la que la enzima taq polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de los cebadores, incorporando los nucleótidos, y que tiene lugar a 72° C.

Estas tres etapas constituyen un ciclo, durante el cual la cantidad de ADN se duplica. El número de ciclos acostumbra a ser de 30 a 40, dando lugar a un incremento exponencial del número de copias que se forman.

En este trabajo se ha realizado la amplificación de una secuencia de bases del gen de la tirosinasa, utilizando los oligonucleótidos descritos por Smith<sup>123</sup> y cuya secuencia se esquematiza a continuación:

<b>HTYR1 (sense)</b>	TTGGCAGATTGTCTGTAGCC
<b>HTYR2 (antisense)</b>	AGGCATTGTGCATGCTGCT
<b>HTRY3 (sense)</b>	GTCTTTATGCAATGGAACGC
<b>HTRY4 (antisense)</b>	GCTATCCCAGTAAGTGGACT

Todos los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración final de 100 pg/ $\mu$ L y se guardaron en alícuotas a -20° C

La mezcla de la reacción de amplificación tenía un volumen final de 50  $\mu$ L y contenía: 50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 0.1 % Triton X-100; 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, y dGTP); 1.5 U de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L)(Gibco-BRL), 0.3  $\mu$ M de los oligonucleótidos HTRY1 y HTRY2 y 4  $\mu$ L del ADNc. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Ericomp). Después de una desnaturalización de 5 minutos a 94°C, se realizaron un total de 35 ciclos según las siguientes condiciones: 60 segundos a 94° C , 65 segundos a 55° C y 65 segundos a 72° C, seguidos por una extensión final de 5 minutos a 72° C.

Posteriormente se realizó una nueva PCR (PCR anidada) en las mismas condiciones descritas, pero utilizando los oligonucleótidos HTRY3 y HTRY4, 1  $\mu$ L de la mezcla de la 1ª PCR y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1.5mM. Podemos ver un diagrama esquemático del proceso en la Fig. 6

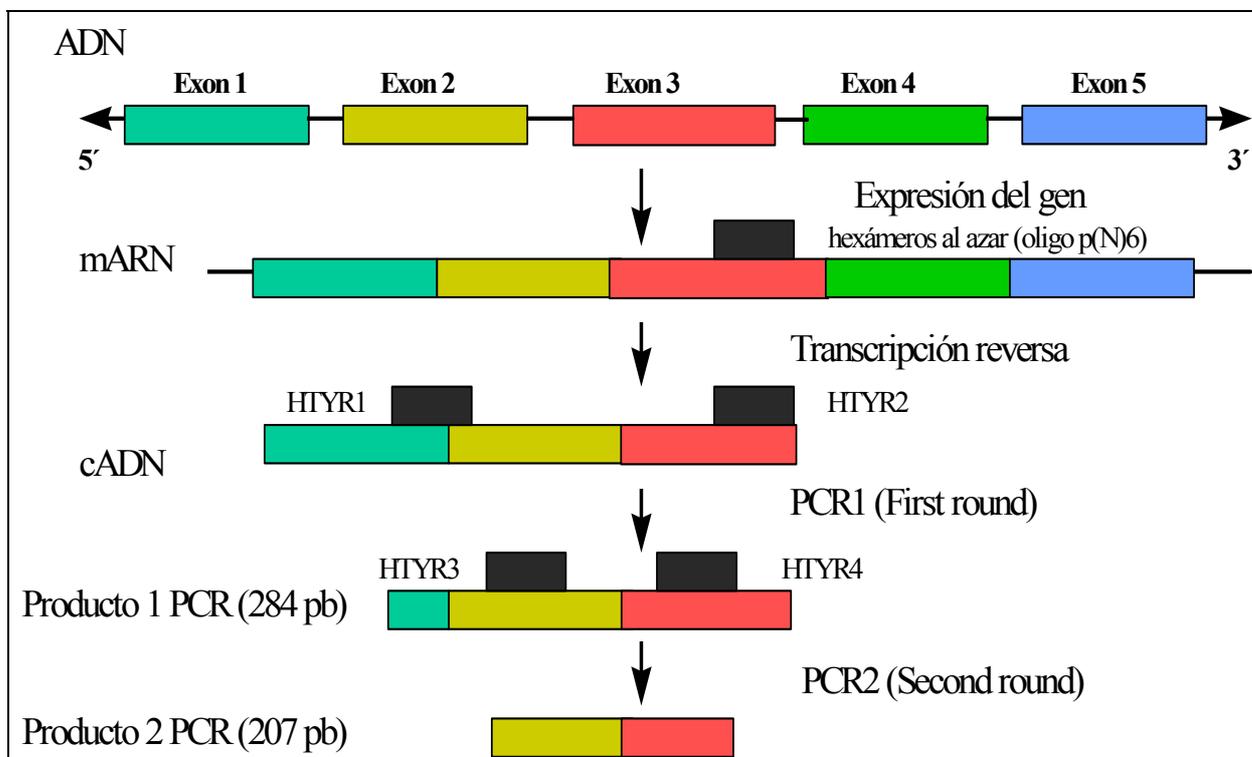


Fig. 6. Diagrama esquemático de la RT-PCR para el ARNm de la tirosinasa

#### 4.6.8. VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, después de la tinción con bromuro de etidio. La agarosa se preparó por calentamiento en microondas hasta su completa disolución y antes de verterla a la placa de electroforesis se le añadió bromuro de etidio (10mgr/mL) al 0,05 %.

Se mezclaron 20  $\mu$ L del producto de PCR con 2  $\mu$ L de la solución de carga y se hacían migrar en el gel de agarosa al 2 % en solución TBE 0.5x (45 mM Tris-Borato; 1 mM EDTA), de forma paralela a un marcador de pares de bases adecuado.

La presencia de un transcrito de 284 pares de bases en la primera PCR y otro de 207 pares de bases en la segunda PCR nos indicaba la presencia de melanocitos circulantes en sangre periférica.





#### 4.6.9. PRODUCTOS COMERCIALES

A continuación se detallan por orden alfabético, los productos de laboratorio (y marca comercial) que se han utilizado en este estudio:

- Acido bórico (Merck)
- Acido clorhídrico (Merck)
- Agarosa (Serva)
- Azul de bromoferol (Merck)
- Bromuro de etidio (Biorad))
- Citrato de sodio (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro de sodio (Merck)
- Dietilpirocarbonato DEPC (Sigma)
- dNTPs: dATP,dCTP,dGTP,dTTP (Gibco-BRL)
- EDTA (Merck)
- Etanol (Merck)
- Ficoll (Seromed)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Ladder 100 bp (Gibco-BRL)
- M-MLV transcriptasa reversa (Gibco-BRL)
- Papel Whatman 3MM
- pd(N)<sub>6</sub>. (Farmacia)
- PBS (Boehringer Mannheim)
- 2-propanol (Merck)
- ARNsin (Promega)
- Sacarosa (Merck)
- SDS (Sigma)
- Tris (Merck)
- Ultraspec<sup>®</sup> (Biotek)
- Xileno cyanol (Kodak)



#### 4.6.10. SOLUCIONES PREPARADAS

A continuación se detallan por orden alfabético, las soluciones utilizadas para la PCR y su forma de preparación

1. **Bromuro de etidio:** Disolver 100 mg en 10 mL de H<sub>2</sub>O (10 mg/mL). Guardar en una botella oscura resguardada de la luz.

#### 2. Solución de ADNc.

• H <sub>2</sub> O DEPC	420 µL
• Tampón 5x first strand	428 µL
• DTT 0,1M	21,5 µL
• dNTPs 25 mM	85,5 µL
• pd(N) <sub>6</sub> 5 mg/mL	45 µL

Hacer alicuotas de 174 µL y congelarlo a -20°

#### 1. 10 mM:

- 10 µL dATP 100 mM
- 10 µL dCTP 100 mM
- 10 µL dTTP 100 mM
- 10 µL dGTP 100 mM

en 60 µL H<sub>2</sub>O. Guardar a -20° C.

#### 1. dNTPs 25 mM:

- 50 µL dATP 100 mM
- 50 µL dCTP 100 mM
- 50 µL dTTP 100 mM
- 50 µL dGTP 100 mM

en 60 µL H<sub>2</sub>O. Guardar a -20° C.

1. **Etanol al 75%:** 37.5 mL etanol absoluto y 12.5 mL de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Guardar a temperatura ambiente.
2. **Ficoll:** densidad 1.077 g/cm<sup>3</sup>. Se conserva a 4° C protegido de la luz. Se debe utilizar a temperatura ambiente.
3. **Gel de agarosa al 2%:** 2 gr. de agarosa en 100 mL de tampón TBE 0.5x. Disolver calentado en microondas.

4. **H<sub>2</sub>O-DEPC**: añadir 0.1 % de DEPC a H<sub>2</sub>O ( 1 mL en 1 L de H<sub>2</sub>O), esperar 24 horas y posteriormente autoclavar.
5. **PBS 10x**: 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,37 M NaCl; 0,027 M KCl pH 7.0.
6. **PBS 1x** : 100 ml de PBS 10x y hasta 1000L de H<sub>2</sub>O destilada pH 7,4.
7. **pd(N)<sub>6</sub>**: al bote liofilizado de la casa Pharmacia añadir 560 µL de H<sub>2</sub>O DEPC (ref. 27-2166-01 Pharmacia 50U)
8. **Solución de carga 6x**:
  - Sacarosa al 40 %
  - azul de bromoferol al 0.25 %
  - 0.25 % de xileno cianol.

Preparación: 20 gr. de sacarosa en 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Añadir 0.125 gr. de azul de bromoferol y 0.125 gr. de xileno cianol.

1. **Solución de carga 1/5**: 200 µL de solución de carga 6x y 800 µL de Tris-EDTA 10/1.
2. **TBE 10X**: 0.9 M Tris (216 gr.); 0.02 M EDTA (18.6 g) y 0.9 M ácido bórico (211 gr.) disuelto en 2 L de H<sub>2</sub>O.
3. **TBE 0.5 x**: 100 mL de TBE 10X y hasta 2000 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
4. **Tris-EDTA 10/1**: 250 µL de tris-HCl pH8; 200 µL EDTA 0.25 M pH 8 y hasta 50 mL de H<sub>2</sub>O.
5. **Tris-HCl 2M**: 484.56 gr. de Tris y hasta 1800 mL de H<sub>2</sub>O; ajustar el pH a 8 con HCl y enrasar finalmente a 2000 mL. Autoclavar.

#### 4.7. VALIDACION DE LA RT-PCR EN LA DETECCIÓN DE METASTASIS

En este apartado se calcularán una serie de índices para valorar la eficacia de la RT-PCR en la detección de metástasis en los pacientes afectos de melanoma maligno de úvea. Consideraremos como el “gold standard”, la radiografía de tórax, la analítica general y la ecografía hepática y se comparará con los resultados de la determinación del ARNm de la tirosinasa mediante la RT-PCR.

##### 4.7.1. PROBABILIDADES PRE-PRUEBA

No se afectan por la prevalencia de la enfermedad.

La **Sensibilidad** en términos de probabilidad se refiere a la probabilidad de ser positivos aquellos pacientes que padecen la enfermedad. Es decir, es la proporción de pacientes con metástasis en los cuales la prueba da positiva (proporción de verdaderos positivos). En contraste la **especificidad** es la proporción de pacientes sin metástasis en los cuales el resultado del test es negativo (proporción de verdaderos negativos).<sup>261</sup>

COCIENTES DE PROBABILIDADES (Likelihood ratio):

El cociente de probabilidades de una prueba diagnóstica compara la probabilidad de que un determinado resultado de la prueba se produzca en un paciente con la enfermedad en estudio, con la probabilidad de que el mismo resultado se obtenga en un paciente libre de esa enfermedad. Se calculará:

- **Cociente de probabilidades positivo**=  $PVP / PFP = \text{Sensibilidad} / 1 - \text{Especificidad}$   
PVP=proporción de verdaderos positivos    PFP= proporción de falsos positivos
- **Cociente de probabilidades negativo**=  $PVN / PFN = \text{Especificidad} / 1 - \text{Sensibilidad}$   
PFN= proporción de falsos negativos    PVN= Proporción de verdaderos negativos.

##### 4.7.2. PROBABILIDADES POSTPRUEBA

Se afectan por la prevalencia de la enfermedad.

El valor predictivo positivo, consiste en la probabilidad de presentar metástasis, en un individuo que sabemos que ha dado positivo al test.

El valor predictivo negativo, consiste en la probabilidad de no presentar metástasis, en un individuo que sabemos que es negativo al test.

- **Valor predictivo positivo** (SENSIBILIDAD DIAGNOSTICA)
- **Valor predictivo negativo** (ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICA)
- **Probabilidad de no tener metástasis con prueba positiva** = 1 - valor predictivo positivo
- **Probabilidad de tener metástasis con la prueba negativa** = 1 - valor predictivo negativo

#### PROBABILIDADES POSTPRUEBA A PARTIR DE LOS COCIENTES DE PROBABILIDADES

Una forma diferente de expresar la probabilidad es como una relación de opuestos (odds), que compara la probabilidad de que un determinado hecho clínico se produzca (p) con la probabilidad de que no se produzca (q= 1 - p).

Las probabilidades de padecer una determinada enfermedad posteriores a una prueba positiva (odds posprueba) se calculan a partir del cociente de probabilidades de una prueba positiva (CP+) a través de la siguiente fórmula:<sup>262,263</sup>

Relación de opuestos (Odds) posterior a la realización de la prueba	=	Relación de opuestos (odds) previa a la realización de la prueba	x	Cociente de probabilidades de una prueba positiva
---	---	--	---	---

Se calcularán los diferentes cocientes de probabilidades postprueba positivos y negativos, según las prevalencias estimadas de enfermedad metastásica en nuestro estudio, y también teniendo en cuenta el tamaño tumoral.<sup>4</sup>

## **5. METODOS ESTADISTICOS**



Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el paquete integrado de análisis estadístico SPSS 10.0.

### **5.1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA**

Se realizó un análisis descriptivo a partir de los datos obtenidos de la visita basal. Todas las variables a estudio se han clasificado en variables cuantitativas (aquellas que pueden medirse numéricamente) y en variables cualitativas (aquellas a las que se les asigna un valor que no expresa cantidad)

En todas las variables cuantitativas se ha determinado la media, la mediana, la desviación típica y el rango (mínimo y máximo) de la serie.

En todas las variables cualitativas se han determinado las frecuencias relativas y las frecuencias absolutas.

### **5.2. ESTADISTICA INFERENCIAL**

Para valorar si existía correlación entre la positividad de la RT-PCR para la tirosinasa (presencia de células circulantes) y el hecho de tener o no melanoma maligno de úvea, se ha utilizado el test estadístico exacto de Fischer, tomando como nivel de significación una  $p < 0.05$ .

Para evaluar si existía alguna relación entre las diferentes variables registradas en los pacientes afectos de melanoma maligno de úvea y la presencia o ausencia de células circulantes se ha utilizado:

- Relaciones entre 2 variables cualitativas:
  1. Test estadístico exacto de Fisher, cuando la frecuencia esperada era inferior a 3 y existían 2 categorías.
  2. Test estadístico  $\chi^2$  de Pearson (Chi-cuadrado de Pearson), en el resto de casos, con la correspondiente corrección de Yates para efectivos esperados entre 3 y 5.
- Relaciones entre una variable cuantitativa y una variable cualitativa (resultado de la RT-PCR)
  1. Test de comparación de medias no paramétrica de Mann-Whitney dada la ausencia de distribución normal en las variables cuantitativas estudiadas.

- Relaciones entre los pacientes positivos a la RT-PCR, en relación al tiempo de seguimiento y a la presencia de enfermedad sistémica:
  3. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (log rank test)
  4. Chi cuadrado de tendencias

En todos estos tests estadísticos se ha tomado como nivel de significación una  $p < 0.05$ .

## **6. RESULTADOS**



## **6.1. PACIENTES.**

Durante el periodo de tiempo comprendido entre Noviembre de 1988 y noviembre de 1998, se ha seleccionado según los criterios de inclusión un grupo de 77 pacientes, con el diagnóstico clínico y en 25 casos anatomopatológico de melanoma maligno de úvea.

Los pacientes fueron remitidos a nuestro servicio, desde diferentes áreas geográficas del territorio español, tal como se detalla a continuación:

- Comunidad Catalana: 73 pacientes
  - \* Barcelona: 63
  - \* Lérida: 2
  - \* Tarragona: 3
  - \* Gerona: 5
- Comunidad Valenciana: 3
- Comunidad Andaluza: 1

A todos ellos, se les extrajo una muestra de sangre tal como se ha descrito en el apartado de métodos. Uno de los 77 pacientes rechazó la extracción sanguínea, tras explicarle la naturaleza del estudio y pedirle su autorización.

En 11 pacientes se produjeron problemas técnicos en el procesamiento de la muestra sanguínea obteniéndose un ARN degradado o insuficiente, por lo que no pudimos realizar la PCR.

Finalmente se contó con 65 pacientes valorables (84,4%), sobre los cuales pudo practicarse la técnica descrita.

### **6.1.1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICAS**

En cuanto al sexo, estudiamos 25 varones (38,5%) y 40 hembras (61,5%). La edad media global de la serie fué de 63,71 años con un rango de 25 a 94 (Desv. típica 14,3). La distribución de pacientes por grupo de edad se puede ver en la Fig 7 y la distribución de pacientes por edades teniendo en cuenta el sexo, se puede ver en la Fig. 8. El mayor porcentaje de pacientes presenta una edad comprendida entre los 50 y 80 años tanto en el sexo masculino como en el femenino.

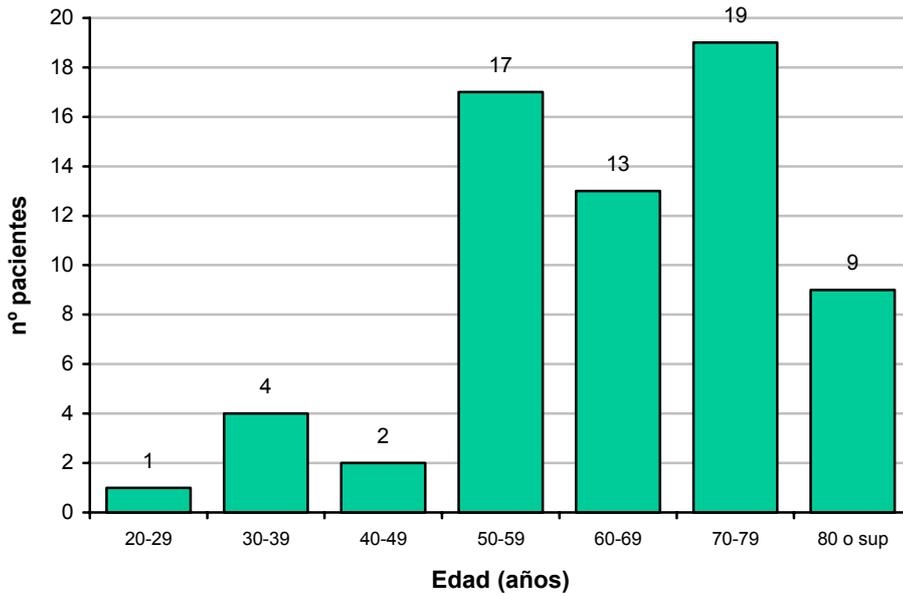


Fig. 7. Distribución por grupos de edad

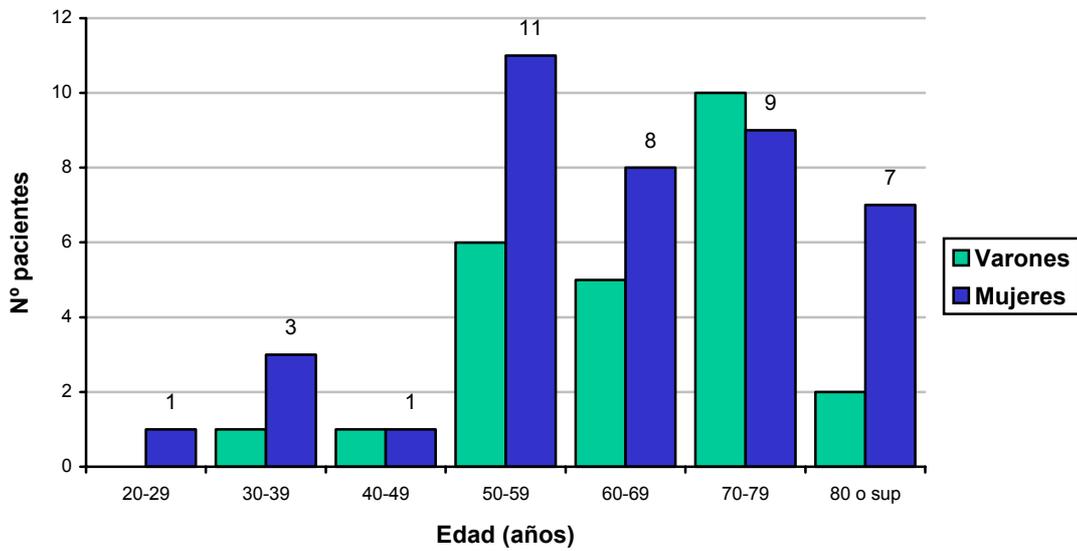


Fig. 8. Distribución por grupos de edad según el sexo

Hemos encontrado una afectación discretamente mayor del ojo izquierdo (58,5%) con respecto al ojo derecho (41,5%) (Fig. 9).

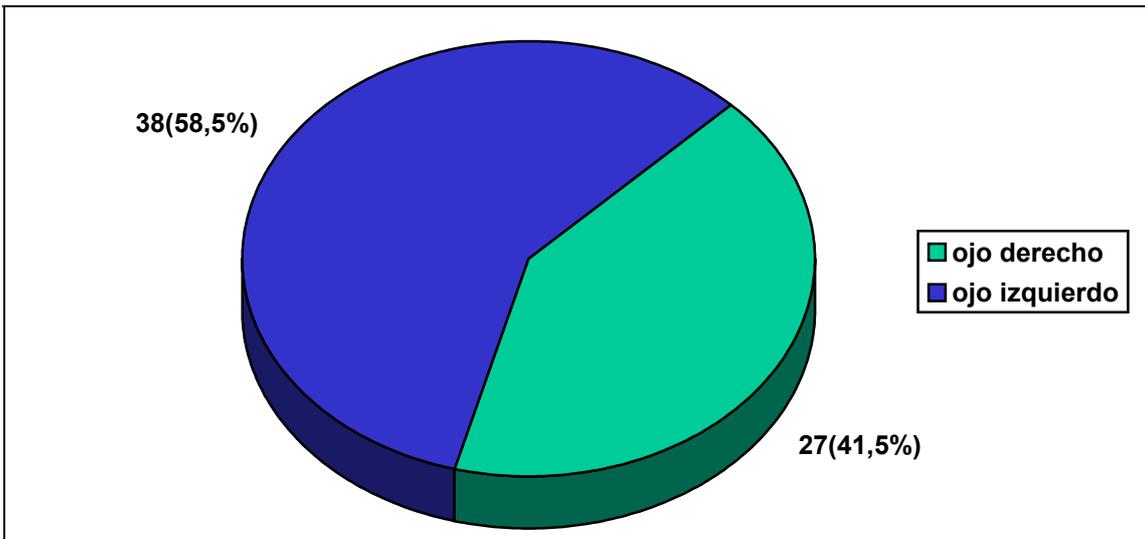


Fig. 9. Distribución según el ojo afecto

La mayoría de pacientes presentaban una agudeza visual de 0,1 o inferior, en el momento del diagnóstico de la tumoración.(Fig. 10)

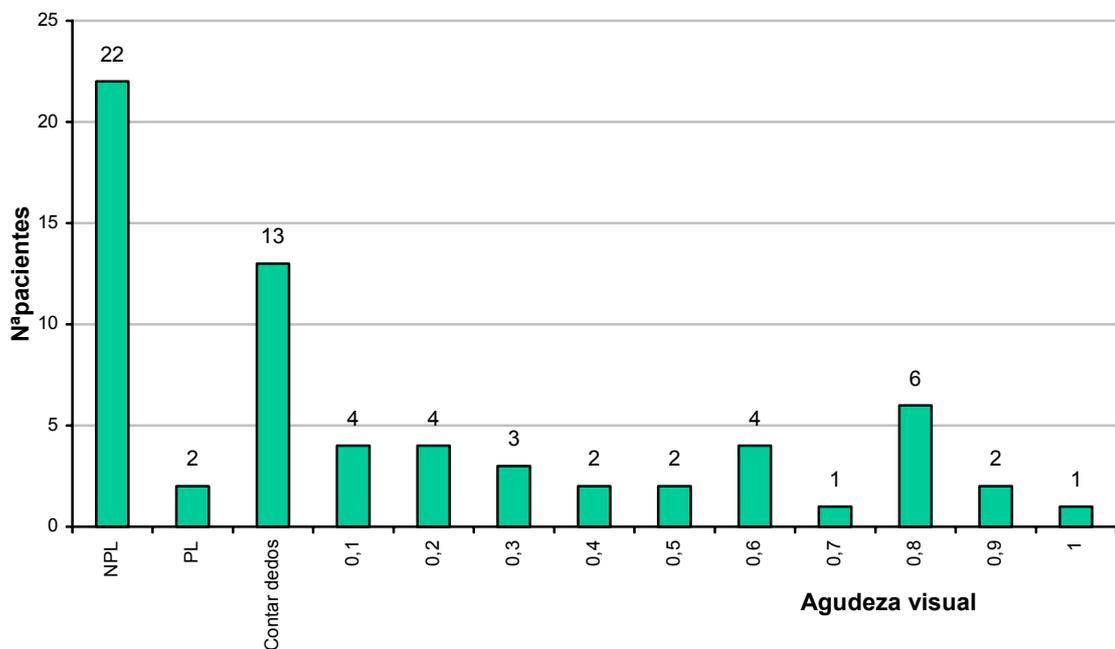


Fig. 10. Distribución según agudeza visual.

En cuanto a los antecedentes oncológicos, se evidenció la presencia de segundas neoplasias en un 9% de pacientes. En uno de los pacientes, que presentaba un adenocarcinoma de mama y en otro que presentaba un linfoma cutáneo de células T, el diagnóstico se realizó tras el hallazgo y tratamiento del melanoma de úvea. El resto de pacientes fueron diagnosticados de la segunda neoplasia previamente al tumor intraocular. La relación de segundas tumoraciones encontradas se detalla a continuación:

1. Un carcinoma escamoso de pene.
2. Un carcinoma basocelular facial.
3. Un melanoma maligno cutáneo y un linfoma cutáneo de células T en el mismo paciente
4. Dos adenocarcinomas de mama.
5. Un carcinoma escamoso de vejiga

En cuanto al origen intraocular de la tumoración, encontramos una afectación más frecuente de la coroides en un 73,8%, respecto del cuerpo ciliar en un 20% y del iris en un 6,2%. (Fig 11)

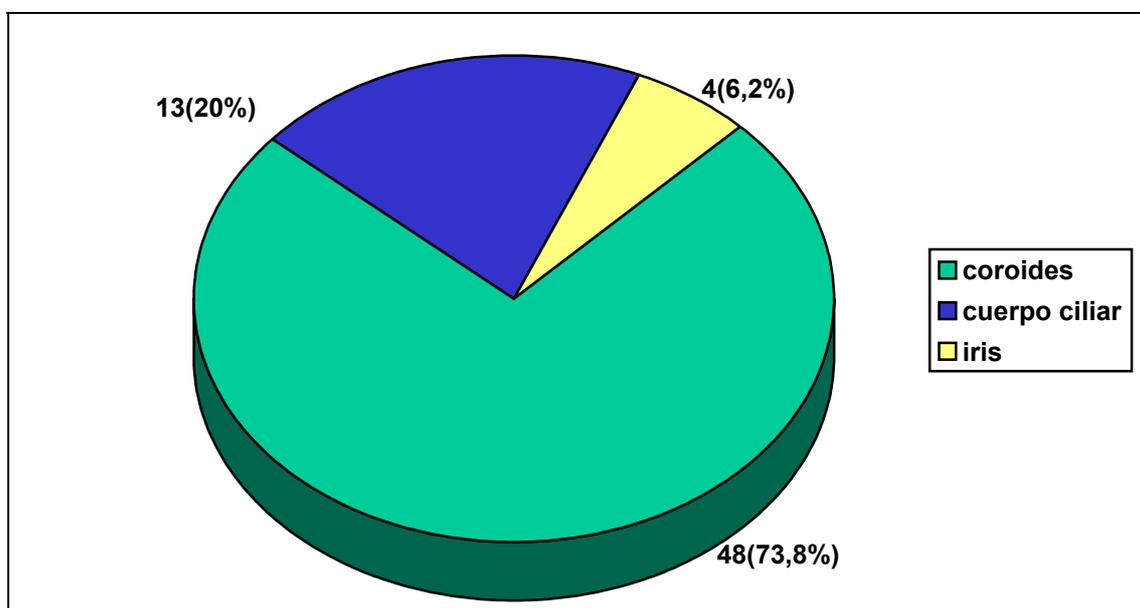


Fig. 11. Distribución según origen tumoral

La distribución de las tumoraciones de acuerdo con su localización sagital y coronal ha sido prácticamente muy similar; habiendo encontrado el mismo número de casos en cada grupo tal como queda reflejado en las Fig. 12 y 13.

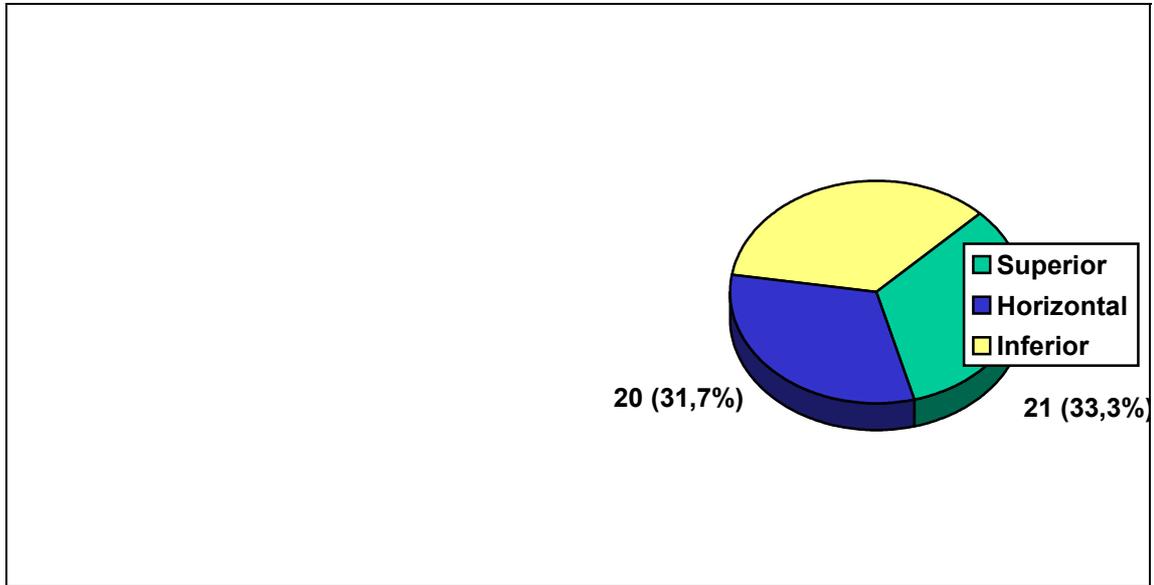


Fig. 12. Distribución según la localización sagital

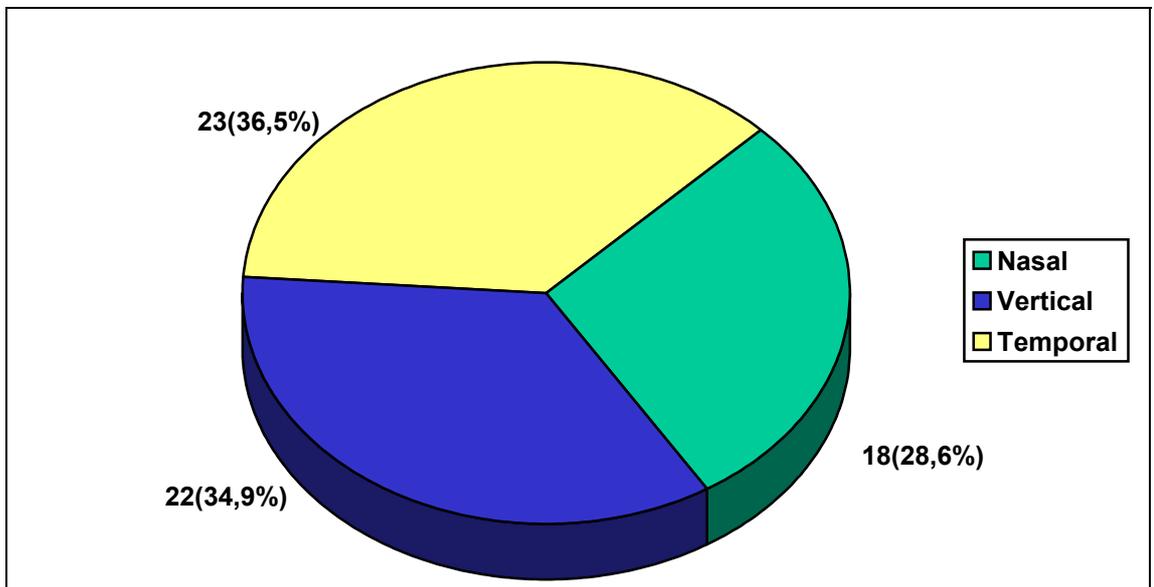


Fig. 13. Distribución según la localización coronal

En cuanto a la localización por sectores hemos constatado un discreto predominio de la región temporal media ( 15,9%), siendo muy similares los porcentajes en el resto de grupos.(Fig. 14)

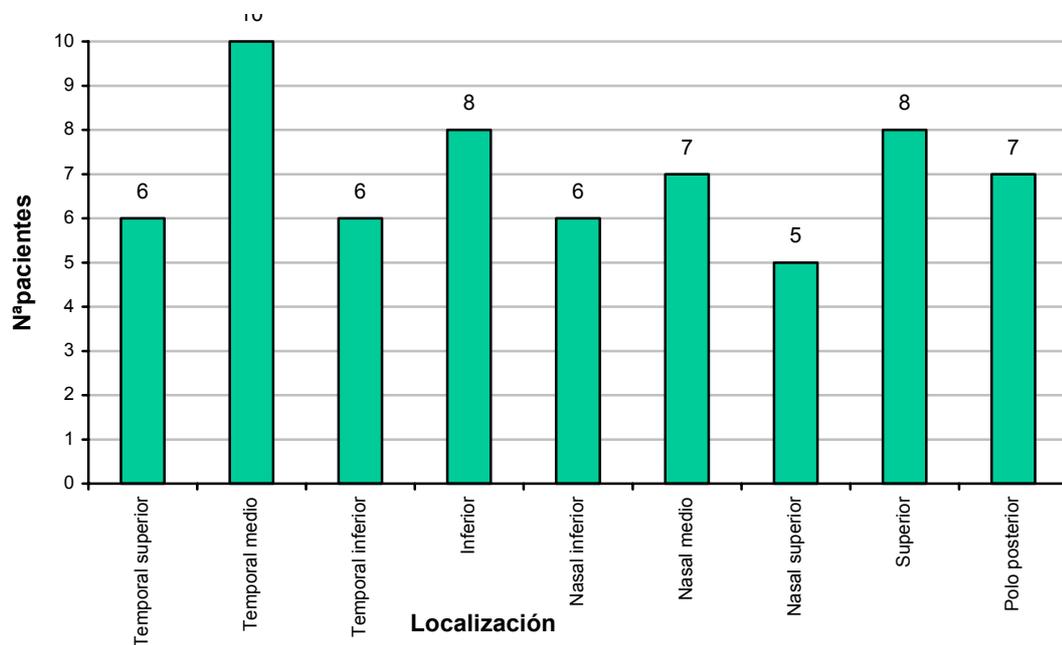


Fig. 14. Distribución según la localización

La localización del margen tumoral anterior ha sido mucho más frecuente en la porción preecuatorial del globo ocular (69,2%) respecto de la retroecuatorial (30,8%), y esta proporción se invierte prácticamente en el caso de la localización del margen posterior, el cual ha sido con mayor frecuencia retroecuatorial (78,5%) que preecuatorial (21,5%). (Fig. 15)

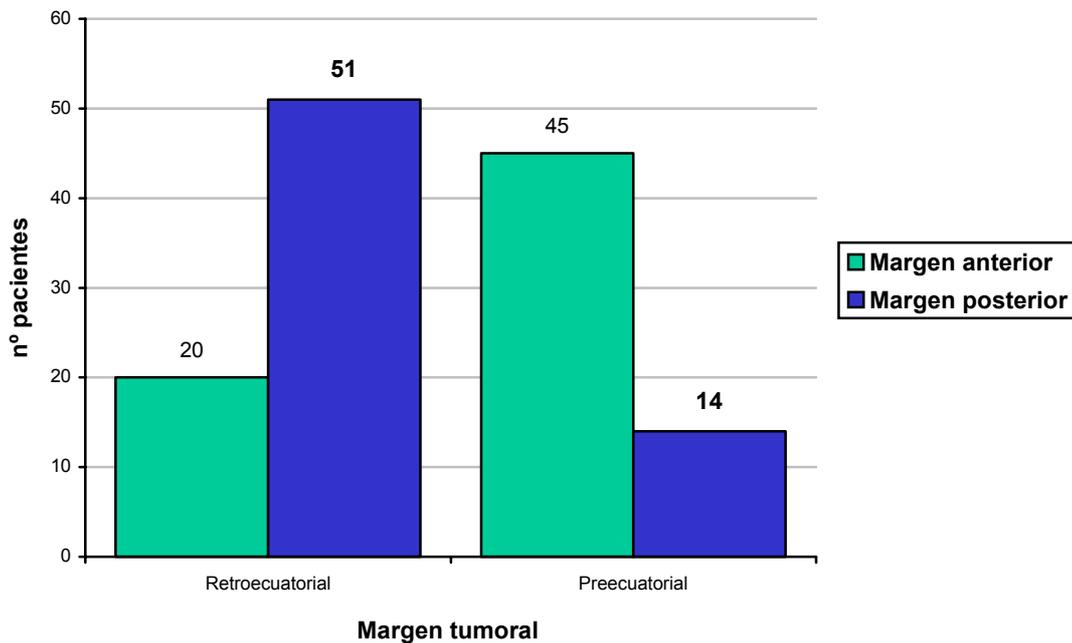


Fig. 15. Distribución del margen tumoral anterior y posterior

Hemos registrado la afectación por la tumoración del disco óptico, cuerpo ciliar, iris y del ángulo camerular en franjas horarias de 1 a 12. La mayor parte de los pacientes no presentaban afectación del disco óptico (87,1%), ni del cuerpo ciliar (82,5%), ni del iris (91,8%), ni del ángulo (90,3%). Por el contrario un 12,9%, un 17,5%, 8,2% y un 9,7% respectivamente, presentaban algún grado de afectación de estas estructuras. (Fig. 16, 17, 18 y 19)

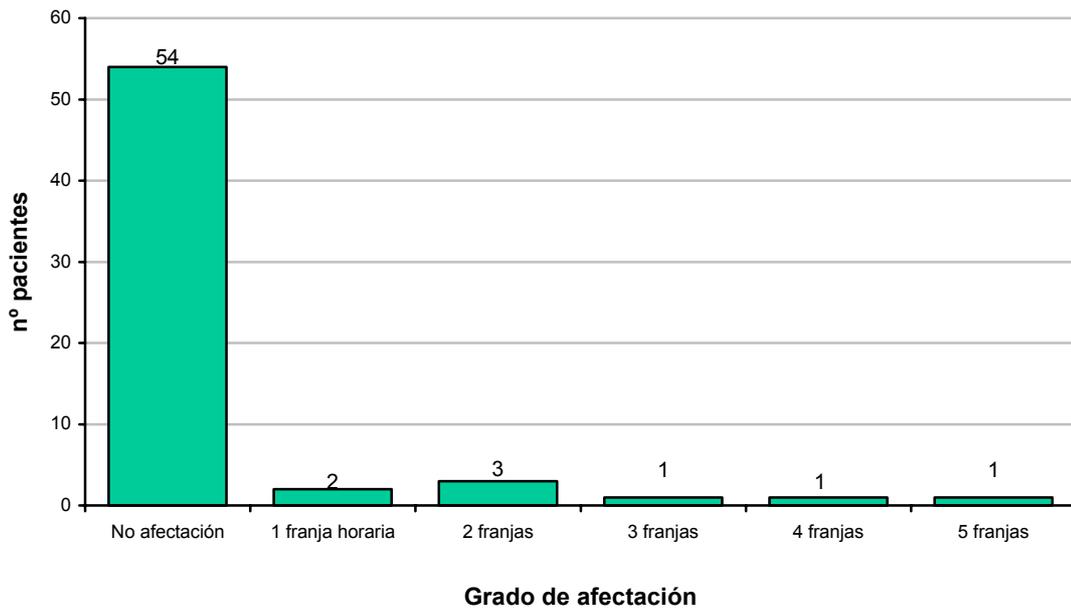


Fig. 16. Grado de afectación del disco óptico en franjas horarias

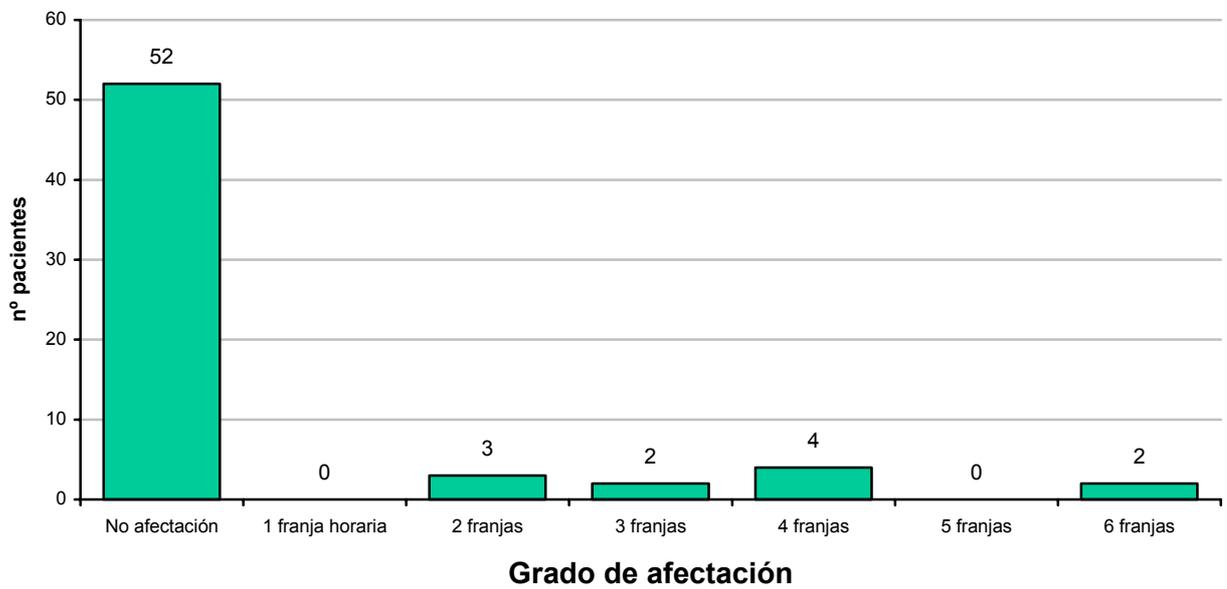


Fig. 17. Grado de afectación del cuerpo ciliar en franjas horarias

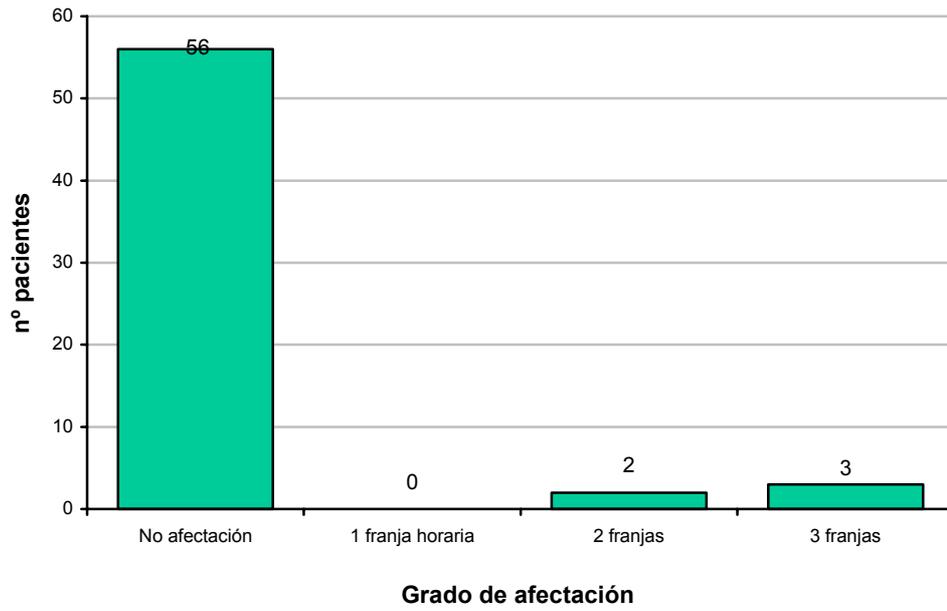


Fig. 18. Grado de afectación del iris

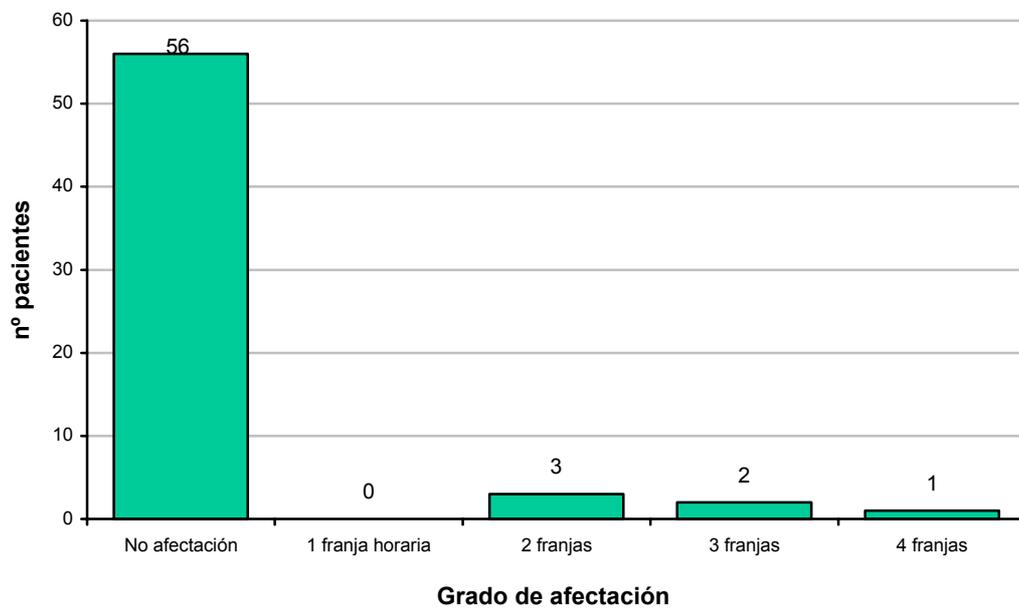


Fig. 19. Grado de afectación del ángulo de la cámara anterior.

En cuanto a la extensión clínica a las estructuras adyacentes, humor vítreo y esclerótica, hemos observado que en la mayoría de esos pacientes no se invadían estas estructuras (95,4%), encontrándose afectación vítrea en el 3,1% y de la esclera en el 1,5%. (Fig. 20)

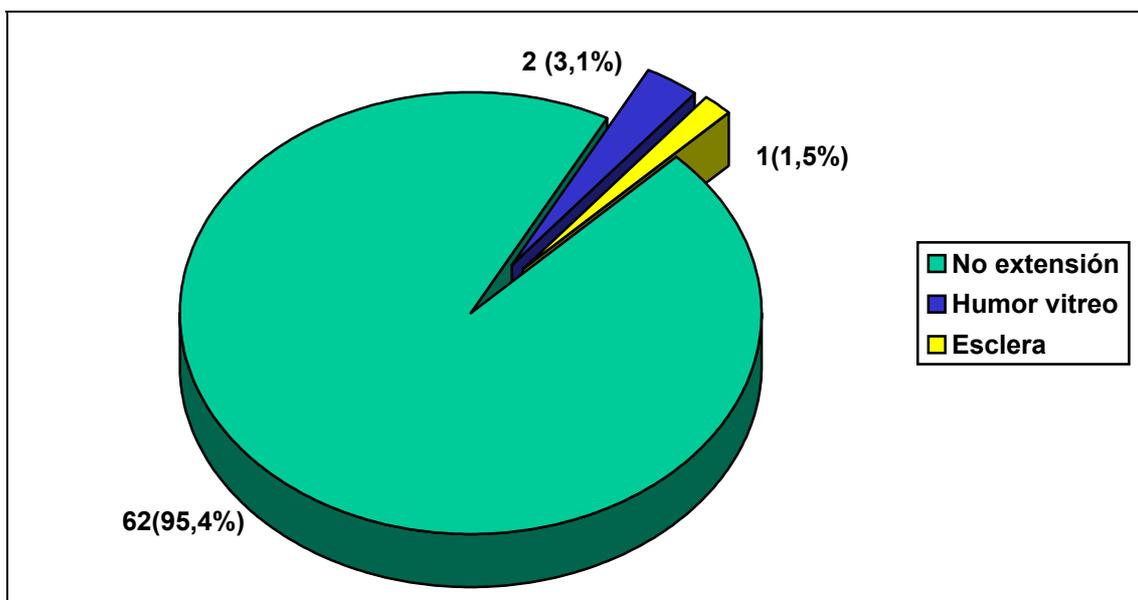


Fig. 20. Distribución según extensión

La presencia clínica de catarata secundaria, glaucoma secundario y rotura de la membrana de Bruch se ha registrado en un 9,2%, 4,6% y 10,8% respectivamente. El desprendimiento secundario de la retina ha sido mucho más frecuente, encontrándose en casi la mitad de casos(44,6%). (Ver Fig. 21). El grado de desprendimiento de retina en porcentaje queda reflejado en la Fig. 22.

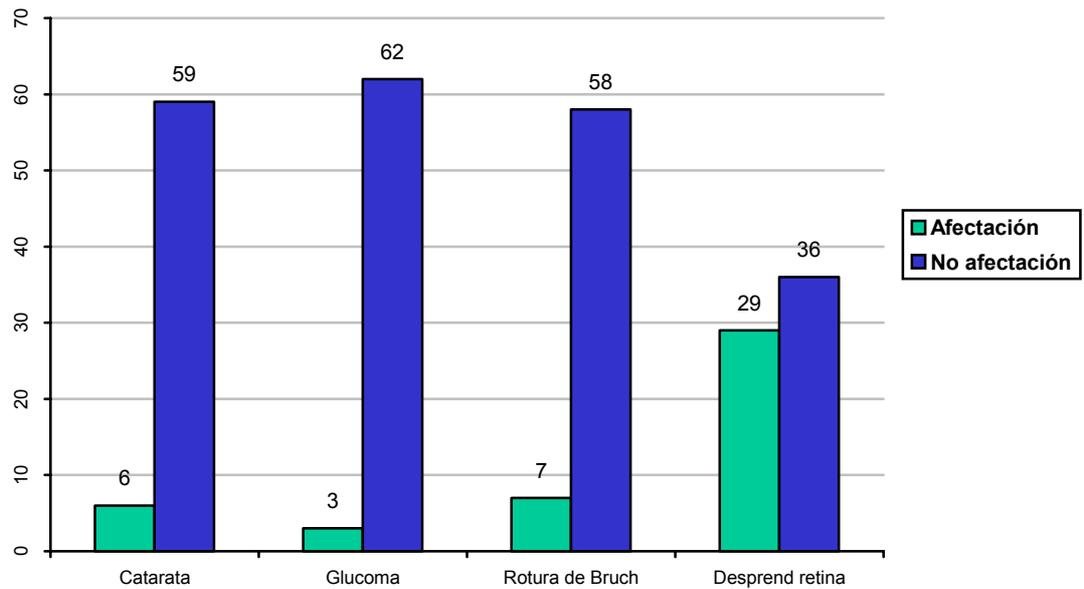


Fig. 21. Distribución según efectos secundarios

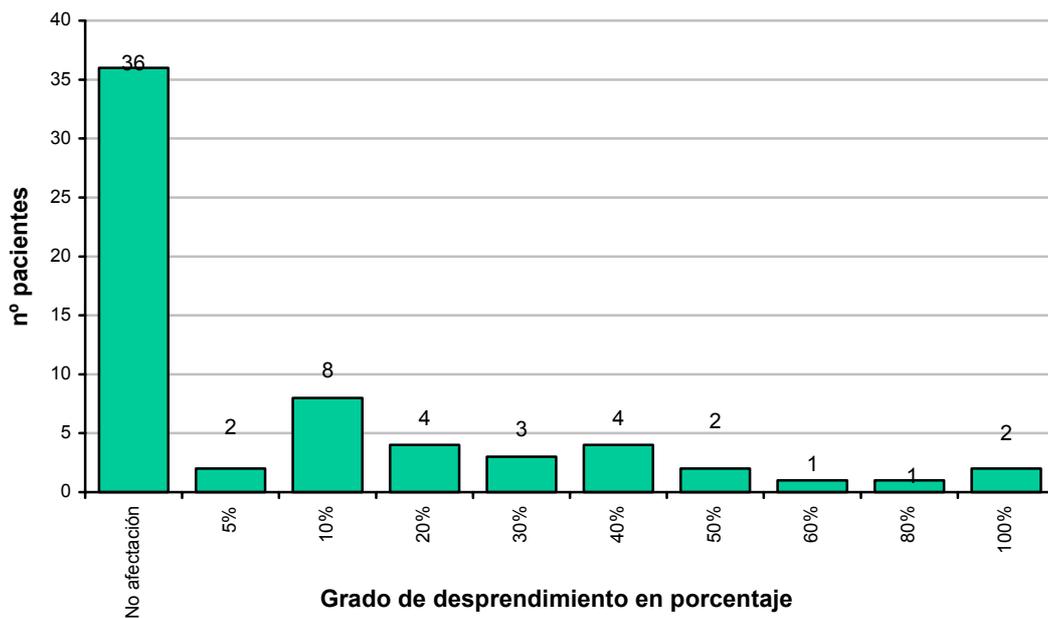


Fig. 22. Distribución de pacientes según el grado de desprendimiento de retina

Categorizamos a las diferentes tumoraciones según la clasificación del COMS, perteneciendo un 13,1% al grupo I, un 49,2% al grupo II y un 37,7% al grupo III. Es, por lo tanto, más frecuente el grupo de los tumores intermedios, seguido por las lesiones de gran tamaño (Fig. 23).

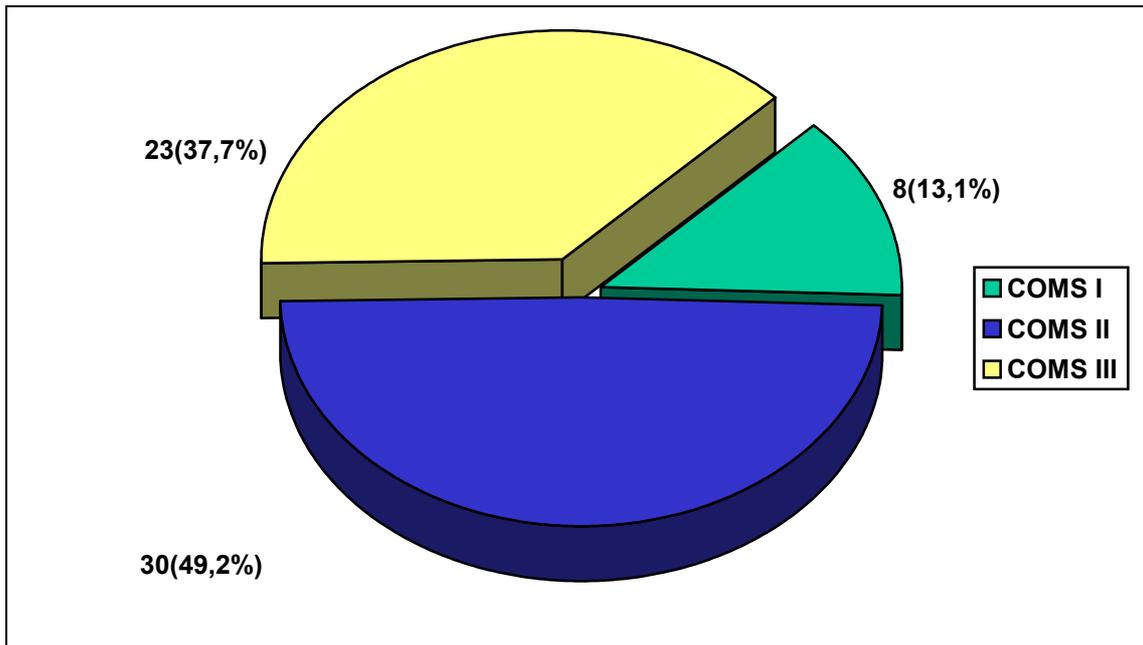


Fig. 23. Distribución según COMS

Las variables clínicas cuantitativas: altura , base horizontal y base vertical tumoral, distancia al disco óptico y a la fovea, y tiempo de seguimientos desde el diagnóstico clínico hasta la extracción, quedan reflejadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de las variables cuantitativas clínicas.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Desv típica
<b>Altura</b>	58	1	15,3	6,49	6,20	3,42
<b>Bhorizont</b>	58	3	20	12,76	12,50	4,62
<b>Bvertical</b>	57	2,5	22	11,82	12,00	4,54
<b>Ddisco</b>	64	0	16	2,62	1,00	4,23
<b>Dfovea</b>	64	0	24	3,14	0,00	6,75
<b>Seguimiento en días</b>	65	11	3725	933,49	656,00	852,57

En cuanto al estado sistémico se categorizaron los pacientes en dos grupos:

- I. Sin evidencia de enfermedad diseminada: 62 pacientes (95,4%)
- II. Con evidencia de enfermedad diseminada: 3 pacientes (4,6%)

Todos los pacientes excepto uno recibieron algún tratamiento para su melanoma de úvea. Hubo un paciente que no fué tratado porque se le propuso la administración de protones acelerados mediante un ciclotrón o

bien la enucleación del globo ocular para controlar su tumoración, siendo ambos rechazados.

Los diferentes tratamientos empleados en esta serie de pacientes fueron (Ver Fig 24):

1. Fotocoagulación con láser de Argón: 1 caso (1,5%)
2. Braquiterapia con Iodo-125: 31 casos (47,7%)
3. Resección local transescleral: 8 casos (12,3%)
4. Enucleación del globo ocular: 17 casos (26,2%)
5. Exenteración orbitaria: 1 caso (1,5%)
6. Radioterapia con protones: 4 casos (6,2%)
7. Endorresección: 2 casos (3,1%)

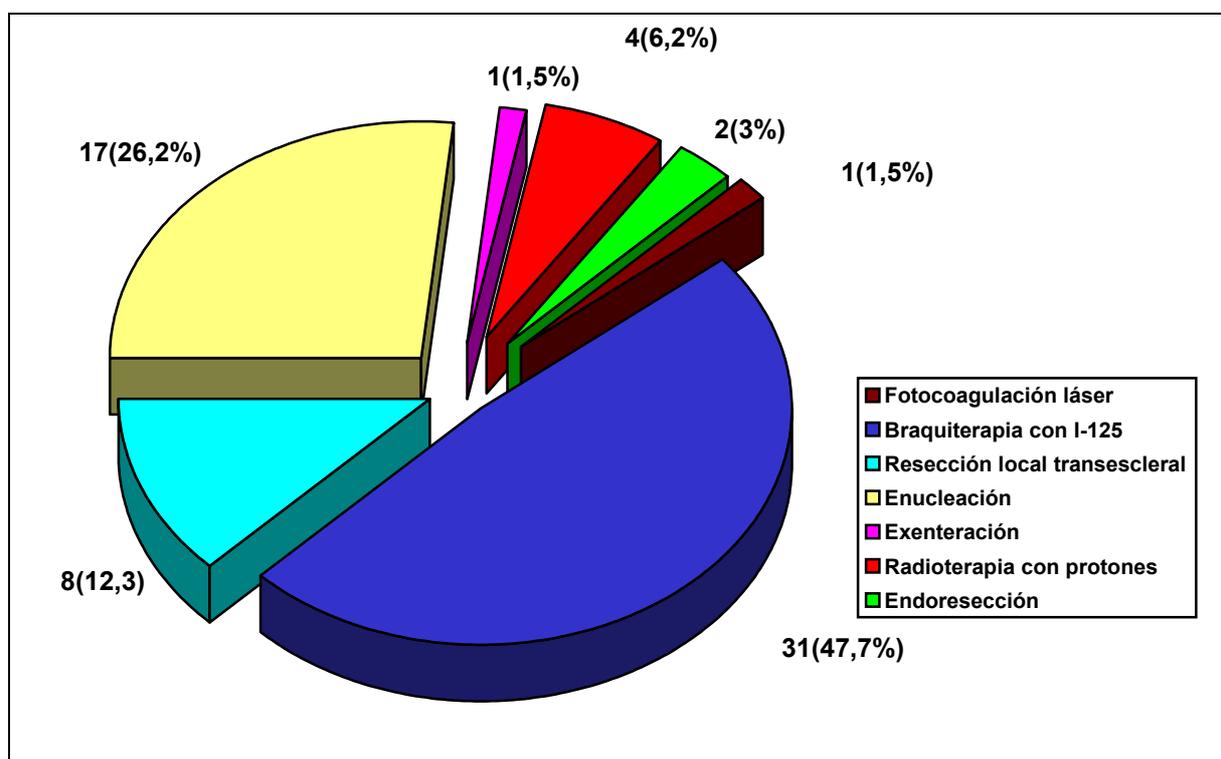


Fig. 24. Distribución según el tratamiento aplicado

Por lo tanto la mayoría de pacientes han recibido un tratamiento conservador del globo ocular (71,9%), respecto de tratamientos mutilantes (enucleación del globo ocular-exenteración orbitaria) (28,1%).

## 6.1.2. ANALISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES ANATOMO-PATOLÓGICAS

De los pacientes tratados mediante enucleación, resección local transescleral, exenteración y endorresección (n=28), se disponía de la pieza anatomopatológica en 25 casos, puesto que los restantes pacientes fueron tratados en otros centros.

En cuanto a las variables cuantitativas, el análisis descriptivo queda reflejado en la Tabla 8.

Tabla 8. Descripción de las variables anatomo-patológicas cuantitativas.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Desv típica
<b>Células fusiformes</b>	24	0	95	42,91	40,00	32,43
<b>Células epiteliodes</b>	24	0	100	52,91	50,00	33,09
<b>Mitosis</b>	23	0	19	3,73	2,00	4,41
<b>Necrosis</b>	25	0	100	13,56	0,00	24,4
<b>PCNA</b>	12	0	18	8,08	9,50	5,58

En cuanto a las variables cualitativas: tipo celular, inflamación, pleomorfismo, infiltración de la esclerótica, infiltración de vorticosas, invasión de la malla trabecular, invasión del iris, invasión del cuerpo ciliar, invasión del humor vítreo, rotura de membrana de Bruch, implantes prerretinianos, y radioterapia previa, se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Descripción de variables anatómo-patológicas cualitativas.

		Numero casos	% del total
<b>Tipo celular (n=24)</b>	Indeterminado	1	4,2
	Tipo I	6	25
	Tipo II	12	50
	Tipo III	5	20,8
<b>Inflamación (n=25)</b>	No inflamación	6	24
	Grado 1	7	28
	Grado 2	3	12
	Grado 3	2	8
	Grado 4	7	28
<b>Pleomorfismo(n=23)</b>	Grado 1	5	21,7
	Grado 2	11	47,8
	Grado 3	6	26,1
	Grado 4	1	4,3
<b>Infiltración esclera(n=26)</b>	no	21	80,8
	si	5	19,2
<b>Infiltración vorticosas(n=26)</b>	no	25	96,2
	si	1	3,8
<b>Invasión trabéculo (n=26)</b>	no	24	92,3
	si	2	7,7
<b>Invasión iris (n=26)</b>	no	23	88,5
	si	3	11,5
<b>Invasión c.ciliar(n=26)</b>	no	25	96,2
	si	1	3,8
<b>Invasión humor vítreo (n=26)</b>	no	25	96,2
	si	1	3,8
<b>Rotura membrana Bruch (n=26)</b>	no	25	96,2
	si	1	3,8
<b>Implantes preretinitianos (n=26)</b>	no	25	96,2
	si	1	3,8

## 6.2. TECNICA RT-PCR

### 6.2.1. CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN

Una vez extraído el ARN, se ha leído su concentración en un espectrofotómetro a 260 y a 280 nm. Tal como se ha descrito en el apartado de material y métodos el cociente debía oscilar entre 1,5 y 2,1 para considerar que el ARN estaba en buenas condiciones. En 11 pacientes la concentración de ARN ha sido insuficiente para realizar la prueba.

En la Fig. 25 se presentan varios pacientes con ARN íntegro.

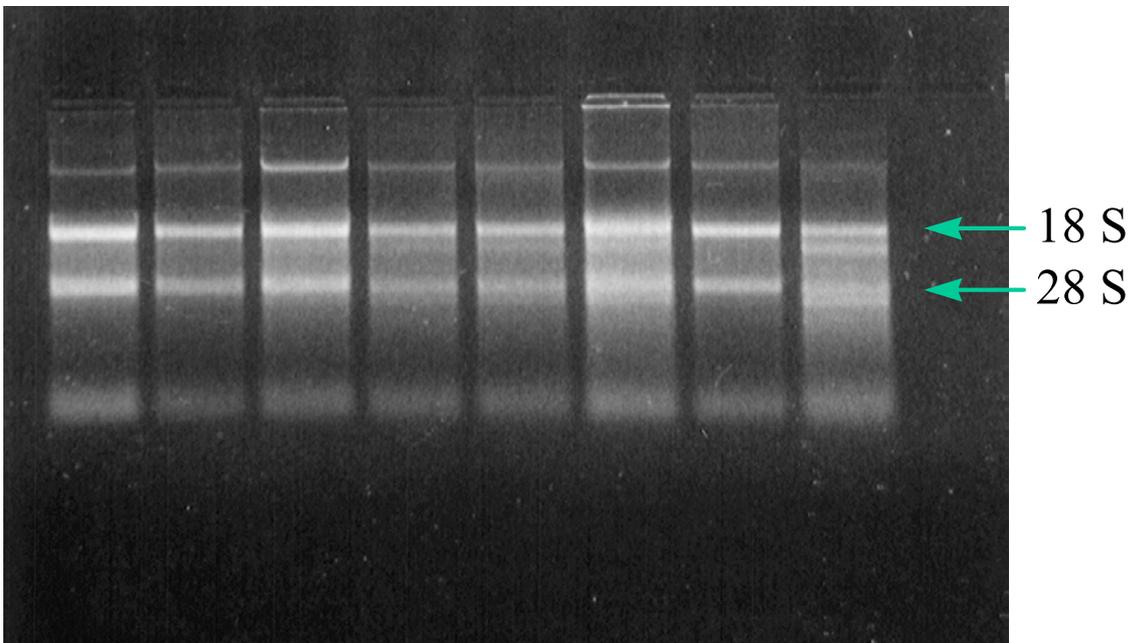


Fig. 25. Integridad del ARN

### 6.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN ABL

Para comprobar que la transcriptasa reversa había sido correcta y de forma indirecta conocer la integridad del ARN utilizado, se amplificó en todos los pacientes una secuencia del gen ABL, presente en todas las células del organismo.

En todos los pacientes se ha observado una correcta expresión del gen ABL. En la Fig. 26 se presentan varios pacientes con la expresión del gen ABL.

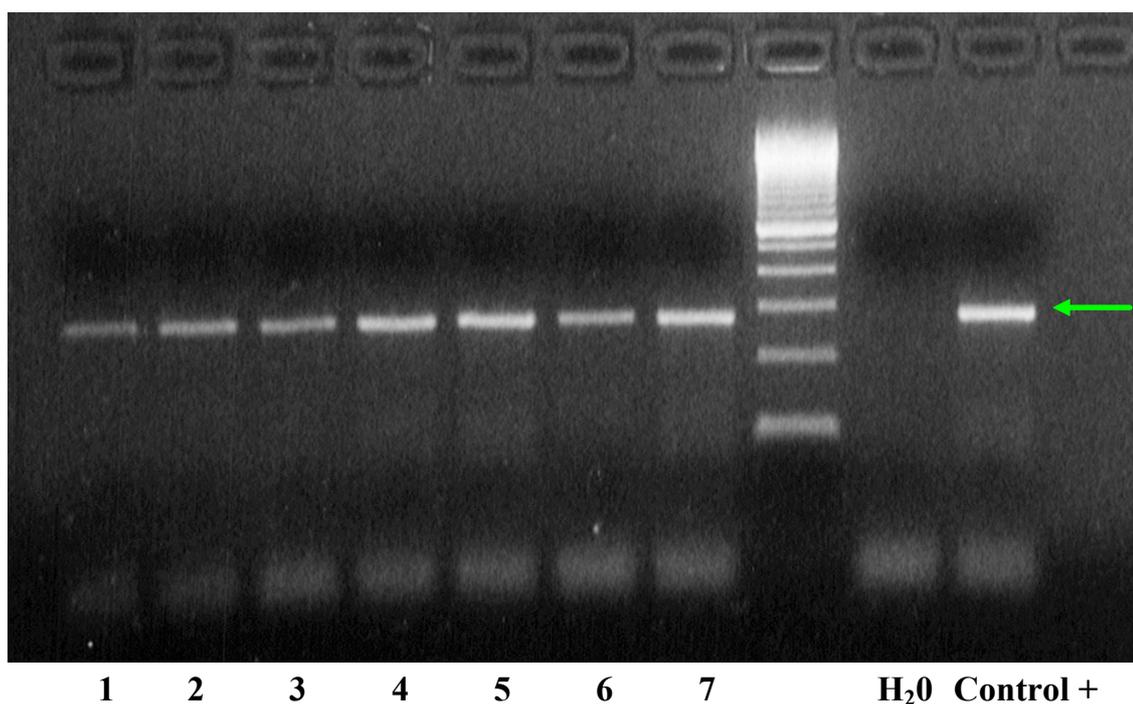


Fig. 26. Amplificación del gen ABL.

### 6.2.3. ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA

Se ha utilizado como grupo control, las muestras sanguíneas de 35 pacientes afectados de hemopatías pero sin evidencia de melanoma maligno de úvea y de 6 pacientes sanos. En todos ellos se ha realizado la RT-PCR para la tirosinasa, siendo negativo el estudio en todos los pacientes.

### 6.3. RESULTADOS EN RELACION CON LOS OBJETIVOS

#### 6.3.1. SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR PARA DETECTAR CÉLULAS CIRCULANTES PROCEDENTES DE LINEAS CELULARES DE MELANOMA DE UVEA

En los análisis de sensibilidad de la técnica se han utilizado diferentes diluciones, tal como se describe en el apartado de material y métodos, de las líneas celulares de melanoma maligno de úvea:

- Línea 92.1
- Línea SP6.5
- Línea SP8.0
- Línea TP31

De la línea celular SP6.5 no se pudieron obtener un suficiente número de células para realizar el estudio de sensibilidad, tras su cultivo.

Para los estudios de sensibilidad se hicieron diluciones de células mononucleadas normales con células de las diferentes líneas, a una concentración total de 10 millones de células.

En el caso de las líneas celulares 92-1; SP8.0 y TP31, la capacidad de detección de la técnica fué de una célula patológica entre 10 millones de células normales, lo cual supone una sensibilidad de  $1/10 \times 10^6$  para cada línea celular. En las Fig. 27, 28 y 29 se muestran las diferentes diluciones realizadas y el resultado de la RT-PCR para cada una de ellas.

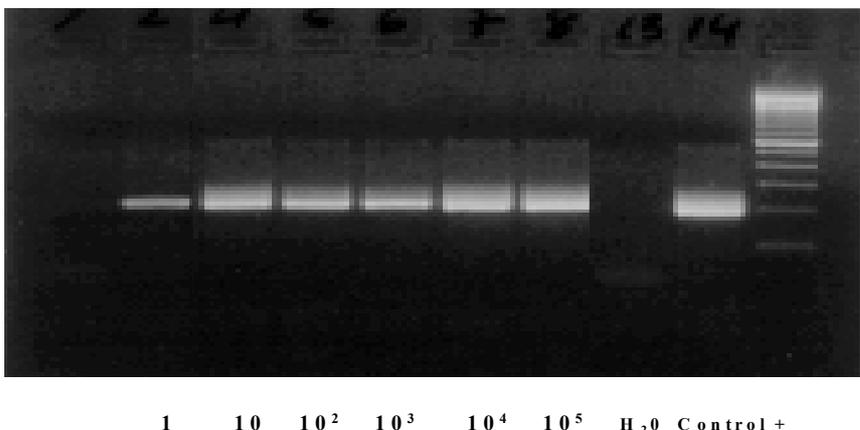
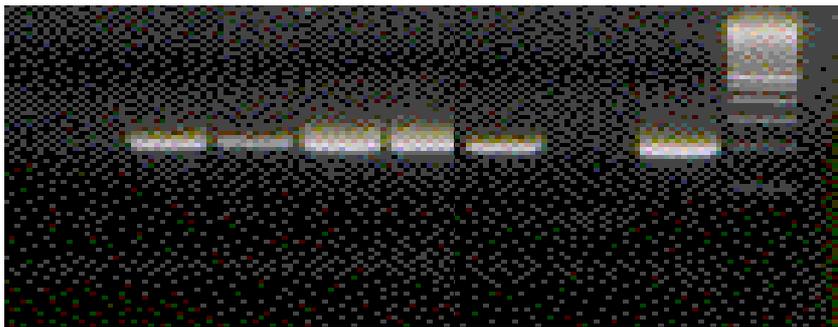
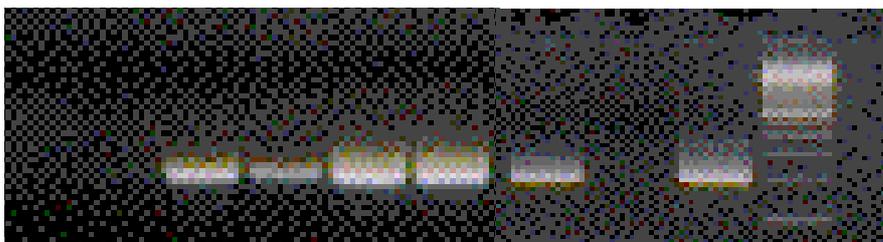


Fig. 27. Sensibilidad de la RT-PCR para la línea celular 92.1. (Los números expresan el número de células de la línea celular, que hemos sido capaces de detectar entre un total de  $10^7$  células normales)



1 10 10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup> H<sub>2</sub>O Control +

Fig. 28. Sensibilidad de la RT-PCR para la línea celular SP8.0. (Los números expresan el número de células de la línea celular , que hemos sido capaces de detectar entre un total de 10<sup>7</sup> células normales)



1 10 10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup> H<sub>2</sub>O Control +

Fig. 29. Sensibilidad de la RT-PCR para la línea celular TP.31. (Los números expresan el número de células de la línea celular , que hemos sido capaces de detectar entre un total de 10<sup>7</sup> células normales)

Teniendo en cuenta que, en 1 ml. de sangre total aproximadamente encontramos 5.10<sup>6</sup> millones de células totales y que de estas un 40% son mononucleadas, ello comporta un total de 2.10<sup>6</sup> células en un ml. de sangre. Así la sensibilidad de la técnica será de aproximadamente 1 célula en 5 ml. de sangre total.

### 6.3.2. DETECTAR MICROMETÁSTASIS EN PACIENTES DIAGNÓSTICADOS DE MELANOMA MALIGNO DE UVEA

Se consideró como resultado positivo, el hecho de amplificar un fragmento de 284 pb en la primera ronda de la PCR y de 207 pb en la segunda ronda del mismo.

Disponíamos de una muestra sanguínea de 106 personas, de las cuales 65 presentaban un melanoma maligno de úvea, 35 una hemopatía maligna y 6 pacientes no presentaban ninguna evidencia de enfermedad.

En aquellos pacientes portadores de un melanoma maligno de úvea, encontramos un total de 4 (6,15%) pacientes positivos y de 61(93,8%) pacientes negativos para la tirosinasa en sangre periférica. Todos los pacientes positivos expresaron una banda de 207 pb. en la segunda ronda de la PCR. En la Fig. 30 puede verse el producto de 207 pb en la segunda PCR en un paciente cuyo suero resultó ser positivo.

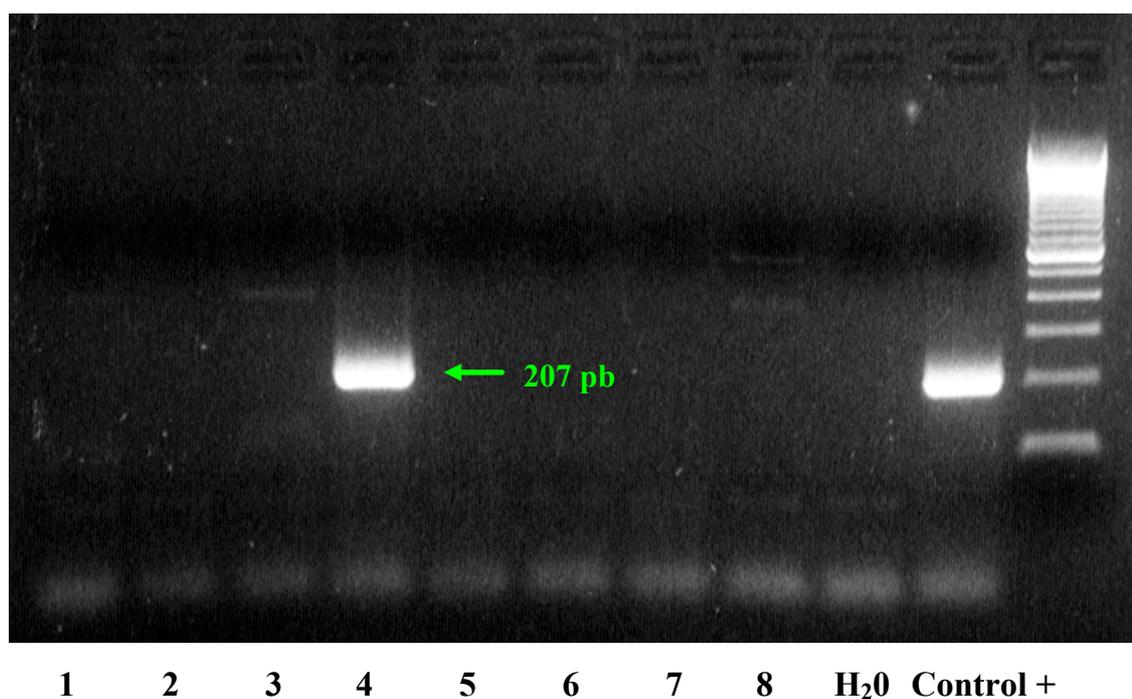


Fig. 30. Amplificación de la tirosinasa (Producto de 207 pb de la 2ª PCR).El paciente número 4 es positivo.

En el caso de los pacientes portadores de una hemopatía maligna y de los pacientes sanos, no se evidenció ningún paciente con la presencia de ARNm de la tirosinasa en sangre periférica. Por lo tanto no hubo ningún caso de

transcripción ilegítima de las células hematopoyéticas, en el grupo control, con las condiciones experimentales que utilizamos.

Los resultados quedan reflejados en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la determinación del ARNm de la tirosinasa mediante la RT-PCR en pacientes portadores de melanoma maligno de úvea y en el grupo control.

	Pacientes afectos de melanoma maligno de úvea (n=65)	Pacientes sin evidencia de melanoma maligno de úvea (n=41)	
<b>RT-PCR positiva</b>	4 <sup>a</sup> (6,2%)	0 <sup>b</sup>	4 (3,8%)
<b>RT-PCR negativa</b>	61 <sup>c</sup> (93,8%)	41 <sup>d</sup> (100%)	102 (96,2%)
<b>Total = 106 casos p=0,157</b>			

- **Sensibilidad** (proporción verdaderos positivos) =  $a / a+c = 4 / 65 = 6,15 \%$
- **Especificidad** (Proporción verdaderos negativos) =  $d / b+d = 41 / 41 = 100\%$
- **Proporción falsos negativos** =  $c / a+c = 61 / 65 = 95,4\%$
- **Proporción falsos positivos** =  $b / b+d = 0 / 41 = 0\%$
- **Valor predictivo positivo** =  $a / a+b = 4 / 4 = 100\%$
- **Valor predictivo negativo** =  $d / c+d = 41 / 102 = 40,19\%$

### 6.3.3. VALIDACIÓN DE LA RT-PCR CON LAS TÉCNICAS CLÁSICAS EN LA DETECCIÓN DE METÁSTASIS.

Tal como se ha descrito en el apartado de material y métodos hemos considerado como el “gold standard” para la detección de metástasis, en pacientes portadores de melanoma maligno de úvea: la radiografía de tórax, analítica general y ecografía hepática y lo hemos comparado con los resultados de la determinación del ARNm de la tirosinasa con la RT-PCR.

Mediante los métodos convencionales, se han identificado 3 pacientes como portadores de metástasis sistémicas en diferentes localizaciones. Los resultados quedan reflejados en la Tabla 11

Tabla 11. Resultados de la determinación del ARNm de la tirosinasa con la RT-PCR en los pacientes portadores de melanoma maligno de úvea, considerando la presencia de metástasis sistémicas.

	Pacientes con evidencia clínica de metástasis (n=3)	Pacientes sin evidencia de metástasis (n=62)
<b>RT-PCR positiva</b>	2 <sup>a</sup> (66,7%)	2 <sup>b</sup> (3,2%)
<b>TR-PCR negativa</b>	1 <sup>c</sup> (33,3%)	60 <sup>d</sup> (96,8%)
<b>Total = 65 casos</b> <b>p= 0,008</b>		

### **PROBABILIDADES PRE-PRUEBA:**

- **Sensibilidad** (Proporción de verdaderos positivos, PVP) =  $a / a+c = 2/3 = 66,6\%$   
IC: 55,2-78
- **Especificidad** (Proporción verdaderos negativos, PVN) =  $d / b+d = 60/62 = 96,77\%$   
IC: 92,43-100
- **Proporción de Falsos negativos** (PFN) =  $c / a+c = 1 / 3 = 33,3\%$  (1 - Sensibilidad)
- **Proporción de Falsos positivos** (PFP) =  $b / b+d = 2 / 62 = 3,22\%$  (1 - Especificidad)

### COCIENTES DE PROBABILIDADES (Likelihood ratio):

- **Cociente de probabilidades positivo** =  $PVP / PFP = \text{Sensibilidad} / 1 - \text{Especificidad} = 0,666 / 0,032 = 20,18$ .  
PVP = proporción de verdaderos positivos    PFP = proporción de falsos positivos
- **Cociente de probabilidades negativo** =  $PVN / PFN = \text{Especificidad} / 1 - \text{Sensibilidad} = 0,967 / 0,333 = 2,9$ .  
PFN = proporción de falsos negativos    PVN = Proporción de verdaderos negativos.

Entre los individuos analizados en esta serie con sospecha de metástasis, esta prueba fué positiva 20 veces con mayor frecuencia entre los pacientes en que se confirmó el diagnóstico que entre los pacientes que se descartó.

El resultado negativo de la prueba se encuentra casi 3 veces más frecuentemente entre los individuos que finalmente no tuvieron metástasis, que entre aquellos que sí las presentaron.

## PROBABILIDADES POSTPRUEBA:

- **Valor predictivo positivo** =  $a / a+b = 2 / 4 = 50 \%$  (SENSIBILIDAD DIAGNOSTICA)  
IC: 38,85 - 62,15
- **Valor predictivo negativo** =  $d / c+d = 59 / 60 = 98,3 \%$  (ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICA)  
IC: 95,16 - 100
- **Probabilidad de no tener metástasis con prueba positiva** =  $1 - \text{valor predictivo positivo} = 50 \%$
- **Probabilidad de tener metástasis con la prueba negativa** =  $1 - \text{valor predictivo negativo} = 1,7 \%$

## PROBABILIDADES POSTPRUEBA A PARTIR DE LOS COCIENTES DE PROBABILIDADES

Relación de opuestos (Odds) posterior a la realización de la prueba	=	Relación de opuestos (odds) previa a la realización de la prueba	x	Cociente de probabilidades de una prueba positiva
---	---	--	---	---

Cociente Probabilidades positivo (Odds postprueba), para la prevalencia de metástasis en nuestro estudio:

1. Probabilidad preprueba:  $\text{Prev} / 1 - \text{Prevalencia} = 0,0468 / 1 - 0,0468 = 0,04 / 0,95 = 0,05$
2. Cociente de probabilidades = 20,18
3. Relación de opuestos =  $0,05 \times 20,18 = 1,009$
4. Transformación en probabilidad postprueba:  
 $1,009 / 1 + 1,009 = 0.502 \times 100 = 50,2\% \text{ (IC: 38,05-62,35)}$

Cociente de probabilidades negativo (Odds postprueba), para la prevalencia de metástasis en nuestro estudio:

1. Probabilidad preprueba:  $\text{Prev} / 1 - \text{Prevalencia} = 0,0468 / 1 - 0,0468 = 0,04 / 0,95 = 0,05$
2. Cociente de probabilidades = 2,9
3. Relación de opuestos =  $0,05 \times 2,9 = 0,145$

4. Transformación en probabilidad postprueba:

$$1,145 / 1 + 1,145 = 0,126 \times 100 = 12,6\% \text{ (IC:4,54-20,66)}$$

En las Tablas 12 y 13, quedan reflejados los diferentes cocientes de probabilidades postprueba positivos y negativos, según las prevalencias estimadas de enfermedad metastásica, teniendo en cuenta el tamaño tumoral.

Tabla 12. Valores de los cocientes de probabilidades postprueba positivos, según diferentes prevalencias de enfermedad metastásica.

		<b>Probabilidades postprueba</b>			
		<b>Prevalencias estimadas (%)</b>			
	<b>CP (+)</b>	<b>4,68</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>53</b>
<b>RT-PCR tirosinasa positiva</b>	20,18	50,2% (IC:38,05-62,35)	79,36%	90,47%	95,79%

Tabla 13. Valores de los cocientes de probabilidades postprueba negativos, según diferentes prevalencias de enfermedad metastásica.

		<b>Probabilidades postprueba</b>			
		<b>Prevalencias estimadas (%)</b>			
	<b>CP (-)</b>	<b>4,68</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>53</b>
<b>RT-PCR tirosinasa negativa</b>	2,9	12,6% (IC:4,54-20,66)	35,52%	57,68%	76,58%

#### 6.3.4. RELACION DE LOS FACTORES CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS CON LA LA PRESENCIA DE CÉLULAS CIRCULANTES.

Se han relacionado los factores clínicos y anátomo-patológicos registrados en la serie de pacientes afectos de melanoma maligno de úvea con la presencia o no de micrometástasis en sangre periférica.

Hemos encontrado relaciones estadísticamente significativas entre la positividad de la RT-PCR y: la afectación de la raíz del iris ( $p= 0,031$ ); la extensión tumoral hacia el humor vítreo ( $p=0,032$ ); la longitud de la base tumoral vertical ( $p=0,025$ ); la evidencia de enfermedad diseminada ( $p=0,008$ ) y con el tiempo de seguimiento ( $p=0,033$ ). Podemos ver estas relaciones de manera gráfica en las Figuras 31, 32, 33 y 34.

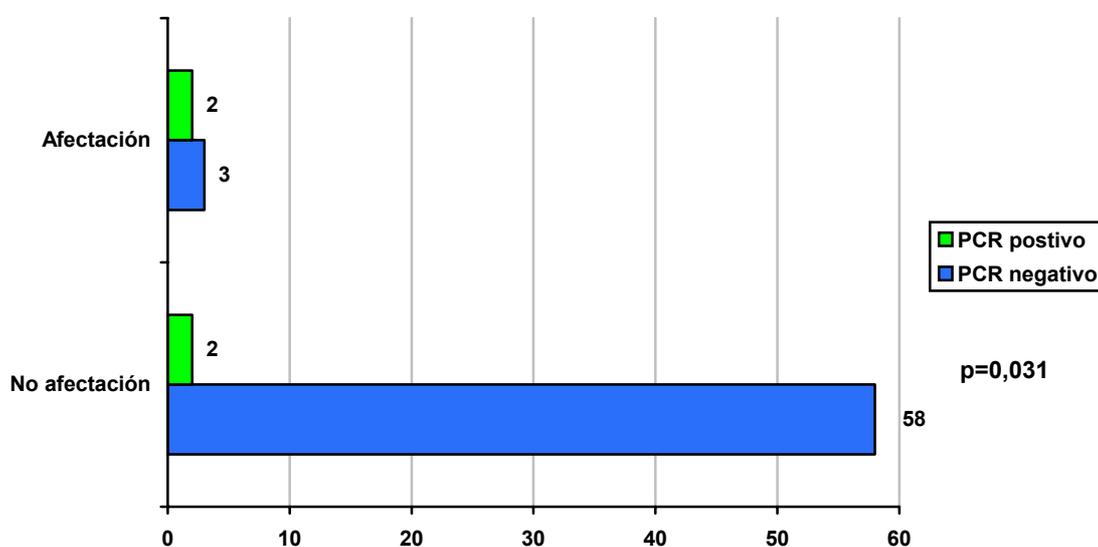


Fig. 31. Relación entre la presencia de afectación de la raíz del iris y el resultado de la PCR.

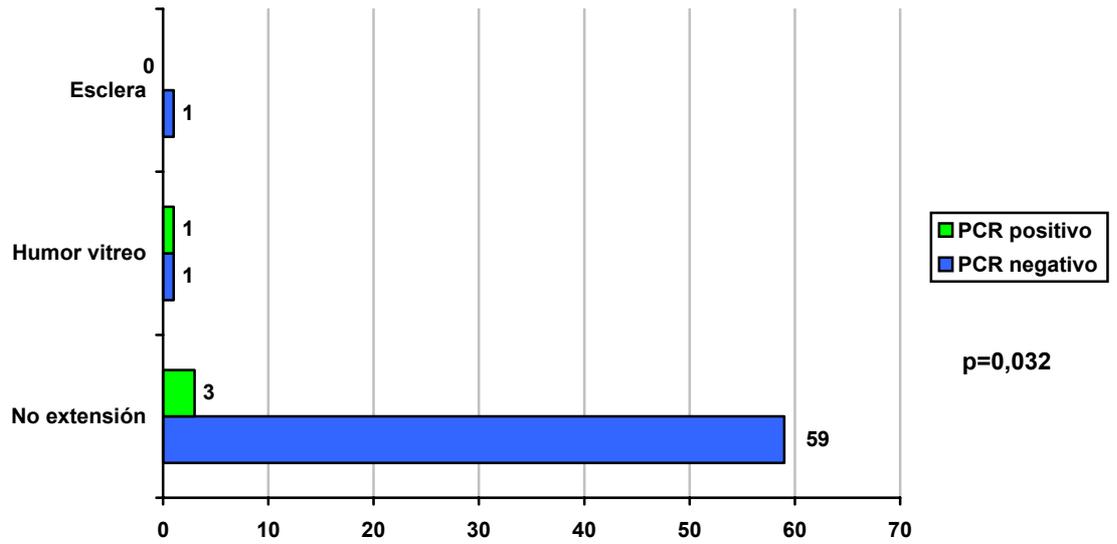


Fig. 32. Relación entre la extensión clínica y el resultado de la PCR.

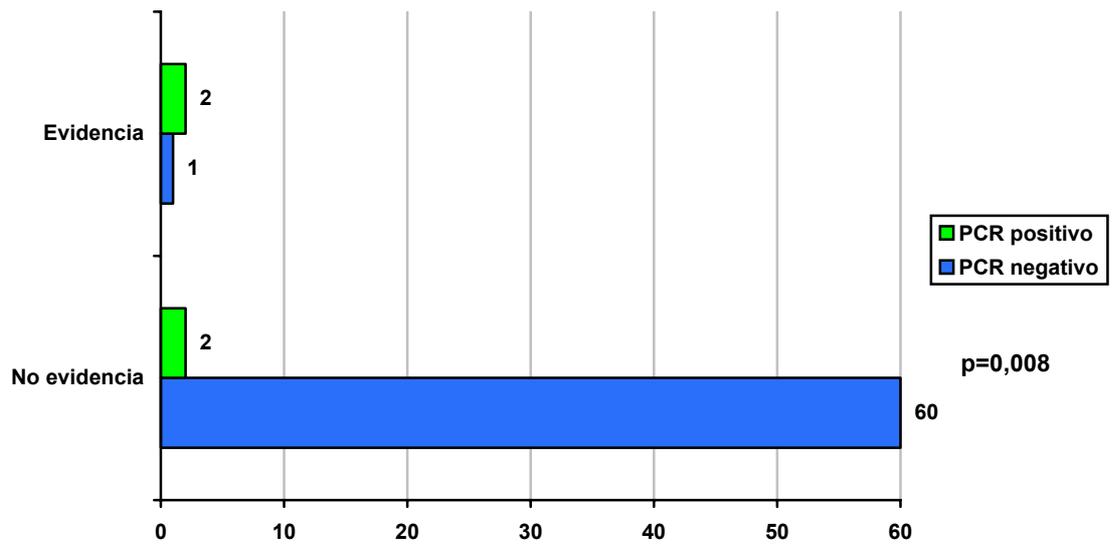


Fig. 33. Relación entre la presencia de enfermedad diseminada y el resultado de la PCR.

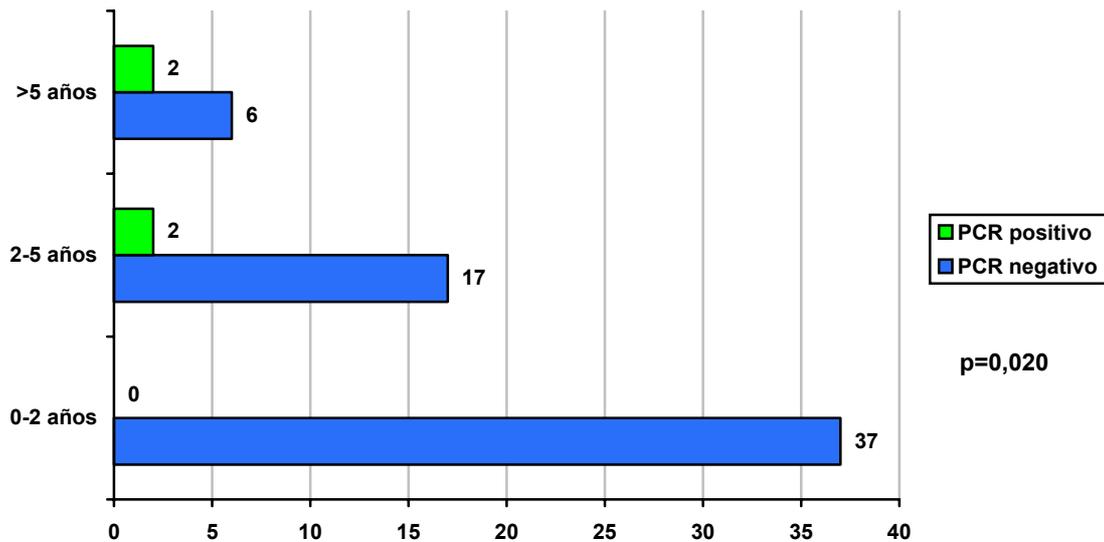


Fig. 34. Relación entre el tiempo de seguimiento y el resultado de la PCR.

Respecto al tiempo de seguimiento, se observa como el porcentaje de pacientes con micrometástasis aumenta progresivamente a medida que aumenta dicho tiempo (Chi cuadrado de tendencias;  $p = 0,009$ ).

Cuando se relacionan mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, la presencia de enfermedad metastásica acumulada respecto al tiempo de seguimiento, entre los pacientes con la RT-PCR positiva a la tirosinasa y los pacientes en que la prueba era negativa. Hemos encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre las dos curvas (log rank test  $p=0,003$ ), tal como podemos ver en la Fig. 35. En este análisis comprobamos como la supervivencia libre de enfermedad a los 122,4 meses (3.672 días) entre los pacientes RT-PCR negativos fué del 98,3%, en contra de los pacientes RT-PCR positivos que fué del 50%.

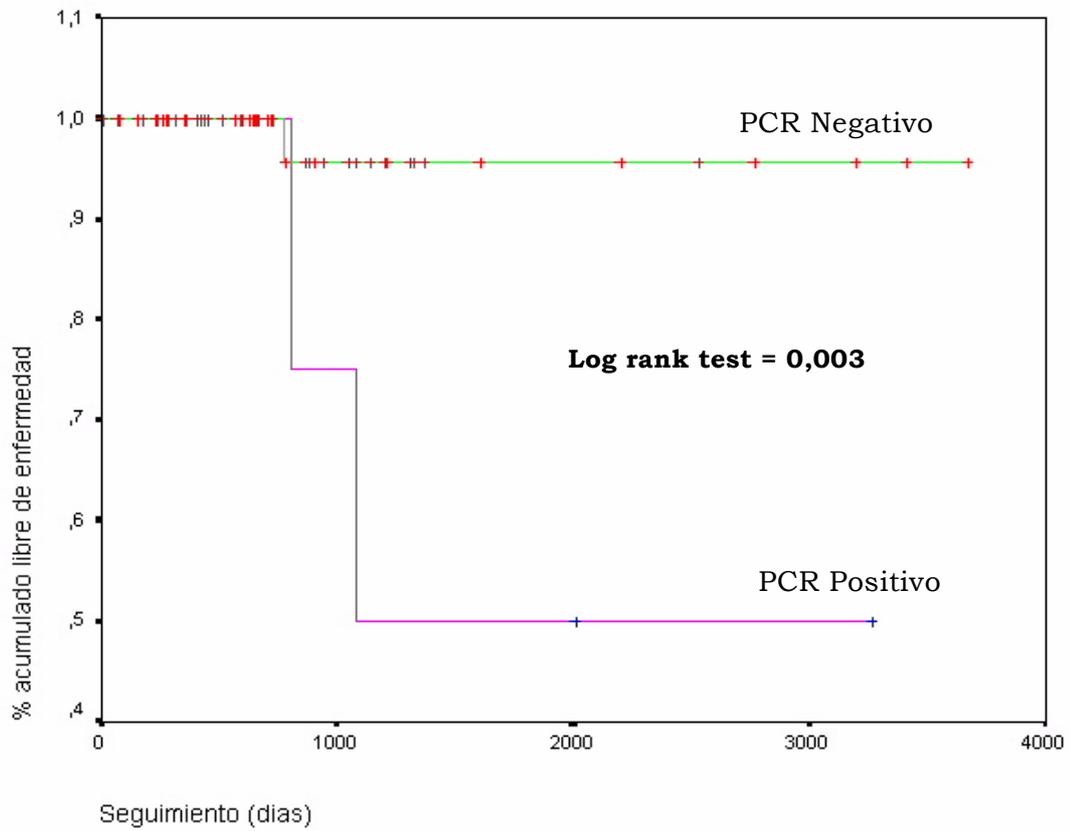


Fig. 35. Porcentaje de metástasis acumulada con el seguimiento respecto al resultado de la PCR. (Curvas de Kaplan-Meyer)

En las Tablas 14 y 15 se presenta un resumen del estudio estadístico de todas las variables, así como se muestra su nivel de significación.

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes en función de la presencia de células circulantes en sangre periférica

	RT-PCR (-)	RT-PCR (+)	p
<b>Edad (años)</b>	62,44 Sd=14,59	64,69 Sd=10,49	0,764
<b>Sexo</b>			1,000
Varón	24(96%)	1(4%)	
Hembra	37(92,5%)	3(7,5%)	
<b>Ojo afecto</b>			1,000
Ojo derecho	25(92,6%)	2(7,4%)	
Ojo izquierdo	36(94,7%)	2(5,3%)	
<b>Agudeza visual</b>			0,154
0,1 o inferior	36(90%)	4(10%)	
Superior a 0,1	25(100%)	0	
<b>Origen tumoral</b>			0,285
Coroides	46(95,8%)	2(4,6%)	
Cuerpo ciliar	11(85,6%)	2(15,4%)	
Iris	4(100%)	0	
<b>Localización</b>			0,745
Temporal superior	6(100%)	0	
Temporal medio	9(90%)	1(10%)	
Temporal inferior	5(83,3%)	1(16,7%)	
Inferior	7(87,5%)	1(12,5%)	
Nasal inferior	5(83,3%)	1(16,7%)	
Nasal medio	7(100%)	0	
Nasal superior	5(100%)	0	
Superior	8(100%)	0	
Polo posterior	7(100%)	0	
<b>Localización sagital</b>			0,178
Superior	21(100%)	0	
Horizontal	19(95%)	1(5%)	
Inferior	19(86,4%)	3(13,6%)	
<b>Localización coronal</b>			0,838
Nasal	17(94,4%)	1(5,6%)	
Vertical	21(95,5%)	1(4,5%)	
Temporal	21(91,3%)	2(8,7%)	
<b>Margen tumoral anterior</b>			0,303
Retroecuatorial	20(100%)	0	
Precuatorial	41(91,1%)	4(8,9%)	
<b>Margen tumoral posterior</b>			0,200
Retroecuatorial	49(96,1%)	2(3,9%)	
Precuatorial	12(85,7%)	2(14,3%)	
<b>Afectación disco óptico</b>			0,433
No afectación	51(94,4%)	3(5,6%)	
Afectación	7(87,5%)	1(12,5%)	
<b>Afectación cuerpo ciliar</b>			0,137
No afectación	50(96,2%)	2(3,8%)	
Afectación	9(81,8%)	2(18,2%)	
<b>Afectación iris</b>			<b>0,031</b>
No afectación	54(96,4%)	2(3,6%)	
Afectación	3(60%)	2(40%)	

<b>Afectación ángulo</b>				0,342
	No afectación	53(94,6%)	3(5,4%)	
	Afectación	5(83,3%)	1(16,7%)	
<b>Extensión clínica</b>				<b>0,032</b>
	No extensión	59(95,2%)	3(4,8%)	
	Humor vítreo	1(50%)	1(50%)	
	Esclera	1(100%)	0	
<b>Segundas neoplasias</b>				1,000
	No neoplasias	55(93,2%)	4(6,8)	
	Otras neoplasias	6(100%)	0	
<b>Catarata secundaria</b>				0,328
	Si	5(81,3%)	1(16,7%)	
	No	56(94,9%)	3(5,1%)	
<b>Glaucoma secundario</b>				1,000
	Si	3(100%)	0	
	No	58(93,5%)	4(6,5%)	
<b>Rotura de Bruch</b>				1,000
	Si	7(100%)	0	
	No	54(93,1%)	4(6,9%)	
<b>Desprendimiento de retina</b>				0,316
	Si	26(89,7%)	3(10,3%)	
	No	35(97,2%)	1(2,8%)	
<b>Altura tumoral</b>		5,75 Sd=3,91	6,30 Sd=1,88	0,939
	<5mm	20(100%)	0	0,288
	> o igual 5 mm	34(89,5%)	4(10,5%)	
<b>Base tumoral horizontal</b>		11,28 Sd=6,03	13,00 Sd=3,56	0,758
	< o igual 10 mm	18(94,7%)	1(5,3%)	1,000
	< 10 mm	43(93,5%)	3(6,5%)	
<b>Base tumoral vertical</b>		9,94 Sd=5,65	16,75 Sd=3,77	<b>0,025</b>
	< o igual 10 mm	22(100%)	0	0,291
	< 10 mm	39(90,7%)	4(9,3%)	
<b>Distancia disco</b>		3,24 Sd=4,58	8,33 Sd=5,50	0,248
<b>Distancia fovea</b>		3,18 Sd=4,98	8,66 Sd=5,03	0,195
<b>COMS</b>				0,266
	I	8(100%)	0	
	II	29(96,7%)	1(3,3%)	
	III	20(87%)	3(13%)	
<b>Estado sistémico(metástasis)</b>				<b>0,008</b>
	No evidencia	60(96,8%)	2(3,2%)	
	Evidencia	1(33,3%)	2(66,7%)	

<b>Tratamiento</b>	Braquiterapia	30(96,8%)	1(3,2%)	0,614
	Otros tratamientos	30(90,9%)	3(9,1%)	
	Enucleación	15(88,2%)	2(11,8%)	0,293
	Otros tratamientos	44(95,7%)	2(4,3%)	
<b>Seguimiento</b>		860,54 Sd= 805,66	1787,00 Sd=1112,95	<b>0,033</b>
	0-2 años	37(100%)	0	<b>0,020</b>
	2-5 años	17(89,5%)	2(10,5%)	
	>5 años	6(75%)	2(25%)	



Tabla 15. Características anátomo-patológicas de los pacientes en función de la presencia de células circulantes en sangre periférica

		RT-PCR (-)	RT-PCR (+)	p
<b>Células fusiformes</b>		39,76 Sd=32,53	65,00 Sd=25,98	0,158
<b>Células epiteliodes</b>		55,47 Sd=33,72	35,00 Sd=25,98	0,252
<b>Tipo celular</b>				0,079
	I	5(83,3%)	1(16,7%)	
	II	12(100%)	0	
	III	3(60%)	2(40%)	
<b>Mitosis</b>		3,55 Sd=4,63	5,00 Sd=2,64	0,143
<b>Necrosis</b>		13,13 Sd=24,48	16,66 Sd=28,86	1
<b>PCNA</b>		8,00 Sd=6,12	8,50 Sd=2,12	0,745
<b>Inflamación</b>				0,402
	No inflamación	6(100%)	0	
	Grado 1	6(85,7%)	1(14,3%)	
	Grado 2	3(100%)	0	
	Grado 3	1(50%)	1(50%)	
	Grado 4	6(85,7%)	1(14,3%)	
<b>Pleomorfismo</b>				0,900
	Grado 1	4(80%)	1(20%)	
	Grado 2	10(90,9%)	1(9,1%)	
	Grado 3	5(83,3%)	1(16,7%)	
	Grado 4	1(100%)	0	
<b>Infiltración esclera</b>				1,000
	No	18(85,7%)	3(14,3%)	
	Si	5(100%)	0	
<b>Infiltración vorticosas</b>				1,000
	No	22(88%)	3(12%)	
	Si	1(100%)	0	
<b>Invasión trabéculo</b>				1,000
	No	21(87,5%)	38(12,5%)	
	Si	2(100%)	0	
<b>Invasión iris</b>				1,000
	No	20(87%)	38(13%)	
	Si	3(100%)	0	
<b>Invasión cuerpo ciliar</b>				1,000
	No	20(87%)	3(13%)	
	Si	3(100%)	0	
<b>Invasión humor vítreo</b>				1,000
	No	22(88%)	3(12%)	
	Si	1(100%)	0	

<b>Rotura membrana Bruch</b>				1,000
	No	22(88%)	3(12%)	
	Si	1(100%)	0	
<b>Inplantas prerretinianos</b>				1,000
	No	22(88%)	3(12%)	
	Si	1(100%)	0	

---

## 7. DISCUSIÓN



En esta tesis presentamos los resultados de nuestra investigación de un marcador molecular de melanocitos o de células de melanoma en sangre periférica, el ARNm de la tirosinasa, con la finalidad de detectar la enfermedad residual mínima.

Con este mismo objetivo, se ha utilizado ampliamente en las neoplasias hematológicas la detección de alteraciones celulares tumorales específicas mediante la PCR,<sup>121,122,128,130</sup> lo que representa un instrumento muy útil, para valorar la respuesta al tratamiento y el seguimiento del paciente.

La técnica de la RT-PCR ha sido recientemente introducida para la detección de células malignas en la sangre periférica, de pacientes con tumoraciones sólidas. En pacientes afectos de neuroblastomas se detecta el ARNm específico neuronal.<sup>227, 228</sup> También se ha utilizado el ARNm para la determinación de la queratina-19 y citoqueratina-19 en el carcinoma de mama, presentando una buena correlación con la presencia de metástasis.<sup>214,215,216</sup> Para el carcinoma de próstata es útil el ARNm del antígeno específico prostático (PSA) y el antígeno de membrana específico prostático (PSAM).<sup>198,199,200,201</sup> Por lo que se refiere al hepatocarcinoma se han empleado el ARNm de la alfa-proteína y el ARNm de la albúmina<sup>189,190,191,192</sup>. En individuos afectos de cáncer gastrointestinal puede ser útil la determinación del ARNm del antígeno carcinoembrionario (CEA).<sup>188</sup>

El presente estudio está basado en una técnica para determinar un marcador específico de tejido y no en una anomalía genética tumoral específica. La tirosinasa se expresa específicamente en los melanocitos o en las células de melanoma. Debido a que los melanocitos no circulan por el torrente sanguíneo, la detección del ARNm de la tirosinasa en sangre periférica, nos indicará la presencia de células de melanoma, es decir, de micrometástasis. El primer trabajo publicado al respecto fué, el de Smith<sup>123</sup> en 1991 y fué además, el primero en demostrar que podían detectarse micrometástasis de tumores sólidos en sangre periférica. Posteriormente, encontramos numerosos trabajos en la literatura que utilizan éste marcador para detectar la enfermedad mínima residual en los pacientes con melanoma

melanoma maligno cutáneo. En algunas de éstas publicaciones, se ha correlacionado el porcentaje de pacientes con evidencia de diseminación de células tumorales, con el estadio de la enfermedad.<sup>164,231,233</sup> En pacientes con enfermedad metastásica franca, los rangos de detección, varían desde un 0% hasta un 100%. Unas diferencias que son atribuibles a los distintos protocolos de los grupos de investigadores. En ninguno de los trabajos se ha encontrado la expresión de la tirosinasa en la sangre periférica, de los pacientes controles, lo cual sugiere una elevada especificidad. Además, no se ha evidenciado el proceso de transcripción ilegítima, que consiste en la amplificación de genes específicos en células no específicas.

Para la realización de esta tesis, se puso en marcha la técnica de la RT-PCR para la detección de la tirosinasa en sangre periférica, con la finalidad de detectar células de melanoma maligno de úvea procedentes de varias líneas de cultivo y la presencia de micrometástasis en pacientes afectos de la misma tumoración. Se ha seguido el mismo protocolo establecido para la detección del producto en sangre periférica de pacientes afectos de melanoma maligno cutáneo.<sup>123, 233</sup>

En nuestro país no existía ninguna experiencia al respecto, y en la literatura internacional sólo encontramos tres trabajos, con un número muy limitado de pacientes, tal como se ha descrito previamente.

Para cumplir este objetivo disponíamos, por un lado de varias líneas celulares de melanoma maligno de úvea (92.1, SP6.5, SP8.0, TP31) y por otro lado de una serie de pacientes afectos clínicamente por esta tumoración. En el análisis de este grupo de individuos hemos constatado una mayor concentración de casos entre los 50 y 80 años de edad con independencia del sexo, siendo la incidencia más baja en los pacientes más jóvenes o en los mayores de 80 años.<sup>26</sup> También hemos observado una mayor incidencia de dicha tumoración en mujeres(61,5%) respecto a los varones (38,5%), tal como se ha descrito en algunas publicaciones.<sup>28,23</sup> En los antecedentes patológicos de éstos pacientes nos ha sorprendido constatar que un 9% presentaban segundas neoplásias. La mayoría de pacientes presentaban una agudeza visual de 0,1 o inferior en el momento del diagnóstico. Las tumoraciones más

frecuentes fueron las de coroides, y en cuanto a su localización espacial hemos constatado una distribución muy homogénea. La localización del margen tumoral anterior ha sido más frecuente en la porción preecuatorial del globo ocular, y ésta proporción se invertía en el caso del margen tumoral posterior. La mayoría de pacientes no presentaban afectación del disco óptico, ni del cuerpo ciliar, ni del iris, ni del ángulo, así como tampoco existía invasión del humor vítreo o de la esclerótica. Encontramos la presencia de catarata secundaria, glaucoma secundario o rotura de la membrana de Bruch en una baja proporción de individuos. En cambio, fué frecuente la presencia de desprendimiento secundario de la retina (44,6%). La altura tumoral media fué de 6,49 mm (rango: 1-15,3), la base horizontal media fué de 12,76 mm. (rango: 3-20), y la base vertical media fué de 11,82 mm. (rango: 2,5-22). Siguiendo la clasificación del COMS un 13,1% de pacientes pertenecía al grupo I, un 49,2% al grupo II, y un 37,7% al grupo III, siendo así, más frecuentes los tumores medios y grandes. La presencia de enfermedad metastásica fué baja (4,6%). En cuanto al tratamiento recibido por estos pacientes, la braquiterapia con iodo-125(47,7%), la enucleación (26,2%), y la resección local transescleral (12,3%) fueron los más frecuentes. Por lo tanto se les había aplicado a la mayoría de ellos un tratamiento conservador.

El primer objetivo de este estudio, era valorar la sensibilidad de la RT-PCR para detectar ARNm del gen de la tirosinasa producido por células de melanoma maligno de úvea en sangre periférica, a partir del cultivo de varias líneas celulares del mismo, puesto que en la literatura internacional sólo hemos encontrado una publicación en la que se hacía un estudio de sensibilidad con las líneas celulares FO-1, FO-2, FO-5 y FO-6, procedentes del cultivo primario de melanoma maligno de úvea, siendo las sensibilidades, respectivamente: 30 células por ml.; 1 célula por ml.; 1 célula por ml.; 30 células por ml.<sup>232</sup>

En nuestro trabajo hemos sido capaces de obtener una sensibilidad muy elevada en la detección de células procedentes de cultivo celular de melanoma maligno de úvea. En todas las líneas para cuyo estudio disponíamos de suficiente material (92.1;SP8.0;TP31), hemos detectado el

ARNm de la tirosinasa producido por una célula de melanoma maligno de úvea entre una muestra de  $10 \times 10^6$  células mononucleadas, lo cual comporta una sensibilidad muy superior a cualquier técnica de citología convencional <sup>102-105</sup> o de inmunohistoquímica <sup>106-118</sup>, y similar a la descrita por otros autores en el melanoma maligno cutáneo.<sup>236,247</sup>

Esta sensibilidad corresponde a la capacidad de detectar una célula de melanoma maligno entre 10 cc. de sangre periférica.

El segundo objetivo de este estudio, era valorar qué proporción de pacientes diagnosticados de melanoma maligno de úvea presentan el ARNm del gen de la tirosinasa detectable en sangre periférica mediante la RT-PCR

Al analizar con la misma técnica las muestras sanguíneas procedentes de 41 pacientes controles negativos (35 pacientes con hemopatías malignas y 6 individuos sanos), ninguno de ellos ha resultado positivo para el ARNm de la tirosinasa. En cambio en los 65 pacientes portadores de un melanoma maligno de úvea, diagnosticados con anterioridad a la extracción sanguínea, hemos constatado 4 casos positivos. Por lo tanto nuestra especificidad ha sido del 100%, puesto que no tenemos ningún falso positivo, es decir ningún paciente no portador de melanoma de úvea ha sido positivo a la prueba.

De la misma manera el valor predictivo positivo es del 100%, ya que un paciente que sea positivo a la prueba presenta un 100% de probabilidades de tener un melanoma maligno de úvea.

Naturalmente, ante estos resultados, podemos afirmar que la técnica diagnóstica carece de utilidad para el cribaje de población general, con la intención de detectar pacientes portadores de melanoma maligno de úvea no diagnosticados, puesto que su sensibilidad es muy baja (4,6%), y el porcentaje de falsos negativos (pacientes con la enfermedad pero con la prueba negativa) es muy elevado(95,4%).

Hasta la fecha sólo hay publicados tres estudios sobre la utilización de la RT-PCR para determinar melanocitos circulantes en el melanoma maligno de úvea; El primero publicado por Tobal y cols en 1993,<sup>252</sup> es un estudio piloto con seis pacientes afectos de melanoma maligno de úvea, dos de los cuales presentaban enfermedad metastásica. De los seis pacientes, tres

fueron positivos a la RT-PCR para la tirosinasa, presentando dos de ellos enfermedad metastásica diagnosticada en el momento de la extracción sanguínea, y el otro la desarrolló a los 9 meses. El segundo trabajo, fué publicado por Foss en 1995<sup>232</sup>, perteneciente al mismo grupo de investigadores, y en el se tomaron 51 muestras de 36 pacientes afectos de melanoma de úvea, y 6 muestras de seis pacientes afectos de melanoma maligno cutáneo en estado metastásico, no consiguiendo ningún positivo a la RT-PCR para la tirosinasa, excepto en un paciente control y en otro con una lesión sospechosa de nevus coroideo. Los autores atribuían el origen de estos falsos positivos a una contaminación de las muestras por melanocitos cutáneos y concluyeron su trabajo con la afirmación de que la RT-PCR para la tirosinasa, no es útil clínicamente para la determinación de enfermedad metastásica, y aseguraron además que el número de células circulantes en sangre periférica es inferior al esperado. Ello lo atribuyeron según los autores, al proceso de filtrado experimentado por los melanocitos a nivel pulmonar y de los capilares periféricos, antes de llegar al sistema venoso periférico.

El tercer trabajo publicado es el de Yosuf El-Shabrawi en 1998<sup>253</sup> y en él se estudiaba el suero de 12 pacientes afectos de melanoma maligno de úvea sin evidencia de metástasis en el momento de la extracción, de los cuales 2 (16,6%) fueron positivos a la RT-PCT para la tirosinasa.

A la vista de estos trabajos clínicos era de esperar que el porcentaje de positividades para la tirosinasa fuera pequeño, puesto que estábamos valorando una serie compuesta por pacientes en diferentes estadios clínicos y además se tomó una sola muestra sanguínea de cada paciente. También hemos de tener en cuenta que estos pacientes habían sido diagnosticados previamente de melanoma maligno de úvea y había transcurrido un tiempo variable desde el diagnóstico de la tumoración hasta el momento de la extracción sanguínea. Este hecho implica una selección natural de aquellos pacientes, que tienen en teoría un mejor pronóstico, debido al tiempo transcurrido sin evidencia de enfermedad metastásica. Probablemente nuestro número de pacientes positivos se incrementaría con tomas seriadas

de sangre a intervalos de tiempo regulares, al igual que ocurre con otras pruebas de rastreo metastásico.

A la vista de nuestros resultados, podemos afirmar que es posible detectar melanocitos circulantes en pacientes afectos de melanoma maligno de úvea, a través de la determinación mediante RT-PCR del ARNm expresado por el gen de la tirosinasa, a pesar de los trabajos publicados en contra de su utilidad.<sup>232</sup>

Existen dos razones que explican las diferencias entre nuestros resultados y los trabajos publicados con anterioridad. Por una lado nuestra serie es, la más extensa publicada que conocemos hasta el momento, y ello hace que los resultados tengan mayor validez. Por otro lado, hemos utilizado como cebador para la retrotranscripción, hexámeros al azar (oligo pd(N)<sub>6</sub>), que confieren una mayor eficiencia a la transcripción reversa. Con estos cebadores, aunque la calidad de las cadenas de ARNm no sea muy buena, es más probable la retrotranscripción de la secuencia que queremos amplificar, en este caso la de la tirosinasa, y por lo tanto ello aumenta la sensibilidad de la prueba. Hemos evidenciado este hecho cuando hemos detectado células procedentes de líneas de melanoma maligno de úvea en sangre de pacientes sanos, en donde hemos determinado una célula patológica entre 10x10<sup>6</sup> sanas, que es una de las sensibilidades más elevadas publicadas hasta el momento. En otro estudio<sup>252</sup> en donde no encontraron ningún positivo entre los pacientes afectos de melanoma de úvea, utilizaron como cebador en la retrotranscripción oligo(dT), que se fija en el extremo de la cadena de ARNm, y que precisa de una mayor integridad de la cadena de ARNm, y por lo tanto su rendimiento puede ser inferior.

El tercer objetivo de esta tesis era confrontar los métodos actuales para el escrutinio sistémico en los pacientes afectos de melanoma maligno de úvea (radiografía de tórax, enzimas hepáticas y ecografía hepática), con la determinación de micrometástasis en sangre periférica a través de la determinación del ARNm de la tirosinasa mediante la RT-PCR.

En nuestro trabajo hemos constatado una evidente diferencia en la detección de células circulantes entre los pacientes afectos de melanoma

maligno de úvea y enfermedad sistémica, respecto a los pacientes sin evidencia de enfermedad sistémica ( $p=0,008$ ). Han sido positivos a la prueba un 66,7% de pacientes portadores de metástasis, respecto a un 3,2% entre los pacientes sin evidencia clínica de metástasis.

A pesar de la evidente diferencia en la detección de células circulantes a favor de los pacientes con enfermedad diseminada, parece contradictorio que enfermos con estadio IV y por lo tanto con localizaciones metastásicas detectadas por métodos clásicos no presenten micrometástasis en sangre periférica, considerando que este último sería un paso previo al asentamiento y proliferación de las células malignas diseminadas por vía hematógena. Existen varias hipótesis para justificar el hecho de que no todos los pacientes con enfermedad diseminada tengan células tumorales circulantes:

- El número de células circulante es escaso, inferior a la sensibilidad o umbral de detección de la técnica del RT-PCR.
- Las células tumorales podrían hallarse secuestradas en las localizaciones metastásicas.
- Las células malignas se liberan al torrente circulatorio de forma intermitente, por lo que serían necesarias extracciones repetidas en diferentes momentos de la enfermedad.<sup>264,265,266</sup>

Asimismo debemos plantearnos qué trascendencia clínica implicará la presencia de micrometástasis en sangre periférica de pacientes que no presentan enfermedad diseminada, y si este hecho condicionará su aparición en un futuro más o menos inmediato.

Aproximadamente un 40% de pacientes con melanoma maligno de úvea a los que se les practica una enucleación, morirán en un intervalo de 10 años por afectación metastásica, generalmente a nivel del hígado.<sup>267</sup> A pesar de ello, es raro el diagnóstico de metástasis clínicamente evidentes en el momento del diagnóstico del tumor primario. Se calcula que se diagnostican alrededor del 1-2 % de los casos usando métodos convencionales como son la radiografía de tórax, la ecografía hepática y los análisis generales con marcadores hepáticos.<sup>268</sup> Estos hallazgos sugieren que las metástasis subclínicas pueden ser más frecuentes de lo que realmente se sospecha.

El término metástasis fué definido por Dorland en 1965<sup>269</sup>, como la transferencia de la enfermedad desde un órgano a otro, no estando ambos directamente conectados entre sí.

El proceso metastásico implica múltiples interacciones entre el tumor y el huésped.<sup>270,271,272</sup> La invasión tumoral y el desarrollo de metástasis engloba una serie de procesos celulares coordinados, entre los cuales, los factores genéticos producen un desequilibrio en la regulación del crecimiento que predispone al desarrollo tumoral. Pero además el proceso metastásico se produce como resultado de un compleja secuencia de pasos. En primer lugar las células tumorales deben liberarse y movilizarse, invadir la matriz extracelular local, atravesar la membrana basal y el endotelio de los vasos sanguíneos. Una vez las células están en el torrente sanguíneo deben evitar su destrucción por el sistema inmune del huésped. Al alcanzar un punto distante, las células tumorales deben de nuevo atravesar el endotelio y la membrana basal de los vasos sanguíneos, antes de alcanzar de nuevo la matriz extracelular. Finalmente, las células deben replicarse sin limitaciones antes de que se desarrollen depósitos tangibles; Un proceso que se denomina la cascada metastásica. Es fundamental la relación entre las células tumorales y la matriz extracelular, para su correcta implantación, de modo que las células deben ser capaces de formar anclajes con dicha matriz, además de secretar nuevos componentes de la misma.

Además se requieren cambios adicionales facilitados por proteínas que estimulen la unión de las células tumorales a la matriz extracelular, la proteólisis de las barreras del huésped, la facilidad de desplazamiento celular y la formación de colonias celulares en la nueva localización metastásica. Por lo tanto, tienen lugar una serie de hechos secuenciales desde el momento en que una célula o grupo de células abandonan el tumor primario, entran en la circulación sistémica, se frenan en el lecho vascular distal, se extravasan en el intersticio del órgano diana y proliferan en esa localización secundaria.<sup>271</sup> Y en cualquiera de esas etapas, además, las células tumorales deben sobrevivir a la inmunidad del huésped.<sup>273,274</sup>

Los modelos animales sugieren que incluso los tumores pequeños pueden lanzar millones de células tumorales a la circulación sistémica, pero el proceso metastásico es un proceso muy selectivo en el que pocas células se mantienen viables, para dar lugar a metástasis establecidas. En un modelo murino desarrollado por Fidler y cols en 1970, se considera que menos de un 0,1% de las células circulantes liberadas sobreviven.

Existen numerosos estudios que intentan correlacionar la presencia de micrometástasis con un aumento de la tasa de recidiva o una disminución de la supervivencia.

En enfermos afectos de leucemia mieloide crónica, aquellos pacientes que presentaban una positividad mantenida a la presencia de células residuales mediante la RT-PCR, presentaban un mayor índice de recaída que los pacientes que, como mínimo presentaban una determinación negativa.<sup>275</sup>

En tumores sólidos, algunos trabajos han correlacionado la presencia de células tumorales en sangre periférica con la recidiva de la enfermedad.<sup>276,162,233,245</sup>

Respecto al melanoma maligno de úvea, en ninguno de los tres trabajos comentados previamente sobre la detección de micrometastasis, se ha demostrado ninguna relación con el pronóstico vital.

En nuestro estudio, la presencia del ARNm de la tirosinasa se relaciona con la existencia de diseminación sistémica ( $p=0,008$ ).

También nos habíamos marcado como objetivo la validación de la RT-PCR como test para la detección de micrometástasis, respecto de las pruebas que utilizamos habitualmente para el rastreo de metástasis, que consideraremos como el “gold standard” (Radiografía de tórax, analítica general, y ecografía hepática).

La sensibilidad de la RT-PCR (proporción de verdaderos positivos) ha sido del 66,7%, y la especificidad (proporción de verdaderos negativos) del 96,7%, lo cual comporta, que entre el grupo de pacientes con metástasis tenemos una probabilidad del 66,7% de que tengan una prueba positiva, y a su vez entre aquellos pacientes sin evidencia de metástasis la probabilidad de tener un test negativo es del 96,7%. Cuando tenemos en cuenta el cociente de

probabilidades positivo (likelihood ratio), que compara la probabilidad de que un resultado positivo de la prueba se produzca en un paciente con metástasis, con la probabilidad de que el mismo resultado se obtenga en un paciente libre de ellas, obtuvimos un valor de 20,18. Esta cifra nos indica que entre los pacientes con sospecha de metástasis, esta prueba fué positiva 20,18 veces con mayor frecuencia en aquellos en los que se confirmó el diagnóstico, que entre los que se descartó. El cociente de probabilidades ofrece la ventaja de que relaciona la sensibilidad y la especificidad en un sólo índice. Estas medidas, sensibilidad, especificidad y cociente de probabilidades, no se afectan por la prevalencia de la enfermedad en estudio.

Por lo que se refiere a las probabilidades postprueba, hemos encontrado un valor predictivo positivo del 50% (Sensibilidad diagnóstica) y un valor predictivo negativo del 98,3% (Especificidad diagnóstica), lo cual significa que en aquellos pacientes en que la prueba es positiva, existe un 50% de probabilidades de que un paciente tenga metástasis sistémicas, y entre aquellos pacientes con la prueba negativa, la probabilidad de tener una metástasis es del 1,7%. Por lo tanto la RT-PCR para la tirosinasa, es un test muy útil en el rastreo de metástasis, puesto que la mitad de las veces podremos confirmarlas, y lo que es mejor, podremos descartarlas con seguridad en los pacientes negativos a la prueba.

Una forma diferente de expresar la probabilidad es como una relación de opuestos (odds), que compara la probabilidad de que un determinado hecho clínico se produzca (p) con la probabilidad de que no se produzca ( $q = 1 - p$ ). En este estudio hemos calculado las odds posteriores a la realización de la prueba, a partir de la odds preprueba y del cociente de probabilidades. Estos valores se ven claramente afectados por la prevalencia de la enfermedad, y en razón de ello se ha segmentado a los pacientes según su estadio tumoral. Así, si tenemos en cuenta toda la serie globalmente, ante un resultado positivo de la RT-PCR, tenemos un 50,2% de probabilidades de que el paciente tenga realmente metástasis. Cuando estratificamos a los pacientes en tumores de tamaño pequeño, mediano o grande según la clasificación del COMS, entonces la “odds” postprueba se incrementa a un 90,47% y 95,79%,

para los tumores medianos y grandes respectivamente. Así pues ante una misma prueba positiva, a mayor tamaño tumoral, y por lo tanto estadio de peor pronóstico, mayores son las probabilidades de presentar metástasis sistémicas.

El cuarto objetivo de esta tesis era describir y relacionar los factores pronósticos conocidos, clínicos y anatómo-patológicos, con el resultado de la determinación del ARNm de la tirosinasa en sangre periférica, mediante la RT-PCR.

Al intentar determinar alguna asociación entre las características clínicas y la presencia de micrometástasis en sangre periférica, la hemos encontrado entre: la invasión de la raíz del iris por la tumoración ( $p=0,031$ ), la extensión tumoral al humor vítreo ( $p=0,032$ ), la base tumoral vertical ( $p=0,025$ ), el estado sistémico ( $p=0,008$ ) y el tiempo de seguimiento calculado desde la fecha de diagnóstico de la tumoración hasta el momento de la extracción sanguínea ( $p=0,02$ ).

Existen numerosas publicaciones en las que se relacionan la edad superior a 60 años con un peor pronóstico vital.<sup>57,61</sup> En este estudio no hemos constatado una relación estadísticamente significativa, ni parece que exista tendencia, entre el resultado de la PCR y la edad, ( $p=0,806$ ).

Cuando valoramos el sexo y la presencia de micrometástasis, no hemos constatado ninguna relación estadísticamente significativa ( $p=1,000$ ). Aunque parece que exista una tendencia a que las mujeres presenten una discreta mayor proporción de células circulantes (7,5%), respecto de los varones (4%). Este hallazgo, contrastaría con la afirmación de algunos autores<sup>57,58,59</sup>, de que el sexo masculino se asocia a un peor pronóstico vital. Dada la escasa diferencia en porcentajes, no podemos definirnos ni a favor ni en contra de esta afirmación.

No se ha observado ninguna relación entre la detección de micrometástasis y la lateralidad del ojo afecto ( $p=1,00$ ), ni hemos encontrado ninguna publicación en la que se relacione el pronóstico vital con dicho factor.

La agudeza visual, catalogada como superior a 0,1 o inferior a 0,1, no ha presentado una relación estadísticamente significativa, aunque se observa una tendencia a presentar mayor porcentaje de micrometástasis en casos de agudezas visuales inferiores a 0,1 ( $p=0,154$ ). Otros autores han encontrado una relación entre el pronóstico vital y la agudeza visual,<sup>61</sup> aunque, hay que tener en cuenta que, la agudeza visual baja, se suele asociar con tumoraciones de mayor tamaño. Su utilidad como factor pronóstico clínico está por lo tanto directamente relacionada con las dimensiones de la tumoración, y probablemente no aporte más información que estas.

Cuando valoramos la localización anatómica donde se origina la tumoración (iris, cuerpo ciliar y coroides), no hemos encontrado una relación estadísticamente significativa ( $p=0,285$ ). Sin embargo parece haber un mayor porcentaje de micrometástasis entre las tumoraciones originadas en el cuerpo ciliar (15,4%), respecto de las que tenían su origen en la coroides (4,6%) o en el iris (0%). Esta tendencia que hemos constatado, ha sido descrita en varias publicaciones, que han relacionado el origen tumoral a nivel del cuerpo ciliar con un peor pronóstico vital.<sup>61</sup>

Cuando consideramos la localización espacial de la tumoración clasificada según sectores ( $p=0,745$ ), bien sea según un plano sagital ( $p=0,178$ ), o según un plano coronal ( $p=0,838$ ) no hemos constatado ninguna relación entre ellas, respecto a la detección de micrometástasis. La única diferencia que hemos constatado es en la posición inferior de la tumoración, que presenta un porcentaje de positivos un poco superior (13,6%), respecto a la posición horizontal (5%) o superior(0%).

Cuando valoramos hasta donde llega el margen anterior de la tumoración, no encontramos ninguna relación significativa ( $p=0,303$ ), aunque la localización preecuatorial presenta un mayor porcentaje de micrometástasis (8,9%), que la localización retroecuatorial (0%). Este hecho es acorde con la literatura, ya que numerosos artículos constatan un peor pronóstico entre aquellos pacientes con tumoraciones cuyo margen anterior está localizado por delante del ecuador.<sup>53,55,56,57</sup> Naturalmente una localización preecuatorial del margen tumoral comporta la mayoría de las

veces una tumoración de mayor tamaño, en una localización aparentemente silente, por lo que su diagnóstico es más tardío y todo ello justifica un peor pronóstico.

En relación con la localización del margen tumoral anterior, hemos valorado la invasión del ángulo, la raíz del iris y el cuerpo ciliar respecto de la presencia de micrometástasis. Se ha constatado una relación estadísticamente significativa entre la invasión de la raíz del iris y la presencia de melanocitos circulantes ( $p=0,031$ ), una situación atribuible a las mismas causas que hemos descrito previamente. Reafirma este hecho el mayor porcentaje de micrometástasis que hemos encontrado en los pacientes con afectación del cuerpo ciliar, de los que el 18,2% presentan células circulantes, respecto a un 3,8% ( $p=0,137$ ). Algo similar ocurre con la afectación del ángulo camerular, en cuyo caso detectamos micrometástasis en el 16,7% respecto del 5,4% ( $p=0,342$ ). Numerosos autores han descrito esta relación entre la afectación del cuerpo ciliar e iris, y el pronóstico vital.<sup>53,55,56,61</sup> No hemos encontrado descripciones que relacionen la afectación del ángulo con la supervivencia.

En cuanto a la localización del margen tumoral posterior ( $p=0,200$ ) y a la afectación del disco óptico ( $p=0,433$ ) no hemos encontrado ninguna relación estadísticamente significativa. Parece existir una mayor tendencia a presentar micrometástasis en los pacientes con el margen tumoral posterior por delante del ecuador (14,3%) respecto de los pacientes con el margen por detrás del ecuador (3,9%). Esta observación estaría en contra de numerosos estudios publicados en la literatura. Por lo que se refiere a la afectación del nervio óptico, podemos comprobar que pacientes afectados presentan mayor porcentaje de células circulantes (12,5%) , respecto de aquellos en los que no hay contacto (5,6%). Coinciden varios autores en que la proximidad u afectación del nervio óptico por el margen posterior es un factor que condiciona el pronóstico vital de los pacientes afectados de melanoma de úvea<sup>61,62</sup>.

En relación a la extensión al humor vítreo, entre los pacientes con presencia de células en el mismo, y por lo tanto con rotura de la membrana

de Bruch e invasión de la retina, hemos observado un 50% de presencia de micrometástasis, respecto de un 4,8% entre los que no presentaban ésta complicación ( $p=0,032$ ). Por el contrario no hemos podido demostrar ésta misma asociación, cuando solamente observábamos la presencia de la rotura de la membrana de Bruch, que se constata oftalmoscópicamente como un crecimiento tumoral en champiñón. Este hecho probablemente es debido a que la mencionada característica clínica representa un estadio de crecimiento menos avanzado que la invasión del humor vítreo, lo cual comporta además invasión de la retina, y por lo tanto de su vascularización. Por otro lado, en la mayoría de casos de afectación vítrea nos enfrentamos a una tumoración de mayor tamaño. Otros autores han descrito la asociación de invasión del humor vítreo con un peor pronóstico vital.<sup>53</sup>

La presencia de segundas neoplasias, ya sea antes, durante o después del diagnóstico de melanoma maligno de úvea, ha presentado una frecuencia elevada en nuestra serie de pacientes (9%), pero este hecho no se ha relacionado con una mayor presencia de melanocitos circulantes en sangre periférica ( $p=1,000$ ). Otros autores han descrito una elevada frecuencia de segundas neoplasias en pacientes afectados de melanoma maligno de úvea. Este hecho puede relacionarse con alteraciones genéticas, que condicionan una predisposición al desarrollo de varias neoplasias, tal como sucede con el síndrome de Li-Fraumeni, en el que se involucran mutaciones a nivel del gen supresor p53(TP53).<sup>93,94</sup>

La presencia de catarata secundaria, no se ha relacionado de manera estadísticamente significativa con la presencia de micrometástasis ( $p=0,328$ ), pero parece haber una tendencia a que la presencia de catarata condicione un mayor porcentaje de melanocitos circulantes(16,7%) con respecto a un cristalino normal (5,1%). Esta observación clínica puede explicarse, por el hecho de que las tumoraciones de mayor tamaño pueden inducir con mayor probabilidad una catarata reactiva, ya sea por contacto directo o bien por factores inflamatorios asociados.

La presencia de glaucoma secundario no se ha relacionado con la existencia de micrometástasis ( $p=1.000$ ), en contra de algunas publicaciones

que sí consideran ésta afectación como factor de mal pronóstico<sup>60</sup>. En general el glaucoma secundario se presenta en aquellas tumoraciones con un crecimiento grande y a menudo difuso, asociado a liberación de células que pueden bloquear la malla trabecular, y por esta vía facilitar su difusión hematológica.

El desprendimiento de retina no se ha relacionado de manera estadísticamente significativa con la presencia de melanocitos circulantes ( $p=0,316$ ). No obstante hay una mayor tendencia a presentar micrometástasis en los pacientes con desprendimiento de retina (10,3%), que en los que no lo presentan (2,8%). Tal como apuntan otros autores, es probable que la presencia de desprendimiento esté condicionada por un mayor volumen tumoral. De esta manera cuanto mayor sea la tumoración, mayores serán las tracciones que induce el ápex tumoral sobre la retina periférica, provocando con mayor facilidad el desprendimiento<sup>60,61</sup>.

Cuando hemos valorado las dimensiones de la tumoración, ya sea en altura o bien en diámetros horizontal o vertical, sólo hemos conseguido obtener un mayor porcentaje estadísticamente significativo, de micrometástasis en los pacientes con una base tumoral vertical de mayor longitud respecto a aquellos cuya longitud es inferior ( $p=0,025$ ). En el caso de la base tumoral horizontal ( $p=0,758$ ), y de la altura ( $p=0,288$ ), no hay diferencias significativas. Aunque aquellos pacientes con una tumoración de altura superior o igual a 5 mm. presentan un mayor porcentaje de micrometástasis (10,5%), respecto de los que presentan una altura menor de 5 mm. (0%). La mayoría de publicaciones sobre factores pronósticos en el melanoma maligno de úvea, encuentran asociación entre los diámetros tumorales y la altura, que en definitiva son las medidas para parametrar una tumoración, y el pronóstico vital de los pacientes<sup>5,53,62</sup>.

En este trabajo hemos conseguido relacionar estadísticamente el diámetro tumoral vertical con la presencia de micrometástasis, y además hemos constatado la misma tendencia en el caso de la altura tumoral, aunque no sea estadísticamente significativo.

Teniendo en cuenta la clasificación del Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS), no hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre los tres grupos de tumores ( $p=0,266$ ), pero si que hemos observado una tendencia a presentar una mayor proporción de micrometástasis, según se trate del grupo I (0%), del grupo II (3,3%), o del grupo III (13%). En definitiva, ésta clasificación basada en las dimensiones de la tumoración nos corrobora lo que habíamos expuesto anteriormente respecto a la altura y diámetros tumorales.

Los factores clínicos, distancia al disco óptico ( $p=0,248$ ) y a la fovea ( $p=0,195$ ), no se han relacionado de manera significativa con la presencia de melanocitos circulantes, al contrario de otros trabajos, que si relacionan la menor distancia al disco óptico como un factor de mal pronóstico<sup>62</sup>.

Cuando valoramos el estado sistémico de los pacientes de nuestra serie y lo confrontamos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica, encontramos una relación que es estadísticamente significativa ( $p=0,008$ ). Es decir entre aquellos pacientes con evidencia clínica de enfermedad diseminada, el porcentaje de casos con melanocitos circulantes (66,7%), es mayor que en los libres de metástasis (3,2%). Esta es una relación lógica, puesto que los pacientes con evidencia de enfermedad metastásica sistémica, tienen mayores probabilidades de presentar melanocitos circulantes en sangre periférica, que se van liberando de los focos metastásicos y pueden anidar en otras localizaciones si encuentran unas condiciones de implantación óptimas. Se discute si esta liberación de células metastásicas se produce de manera continua en el tiempo, o bien si tiene lugar de forma discontinua. Por lo tanto, para diagnosticar el mayor número de pacientes que presentan micrometástasis, es del todo necesario realizar extracciones sanguíneas de manera seriada en el tiempo, para aumentar la probabilidad de detectar alguna liberación de células en el torrente vascular.

Cuando consideramos el seguimiento de los pacientes, es decir el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la tumoración hasta la fecha de la extracción sanguínea, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa ( $p=0,033$ ), respecto de la presencia de melanocitos circulantes.

De tal manera que la proporción de pacientes con micrometástasis aumentaba, conforme lo hacía el periodo de seguimiento. Así aquellos pacientes con un seguimiento de 0 a 2 años, presentaban un 0% de micrometástasis, aquellos con un seguimiento de 2 a 5 años, un 10,5% y aquellos con un seguimiento superior a 5 años, el porcentaje se elevaba al 25%. Esta tendencia creciente también era estadísticamente significativa mediante el test de chi-cuadrado de tendencias ( $p=0,009$ ).

La última observación, también queda reflejada mediante el método de Kaplan-Meier ( $\log \text{rank}= 0,003$ ), en el que relacionamos la enfermedad metastásica acumulada con el seguimiento, respecto el resultado de la PCR. En éste análisis podemos ver como la supervivencia libre de enfermedad a los 122,4 meses (3.672 días) entre los pacientes RT-PCR-negativos fué del 98,33%, en contra de los pacientes RT-PCR-positivos que fué del 50%. Por lo tanto la detección de melanocitos circulantes en sangre periférica en nuestra serie podría tener un valor pronóstico en cuanto a recidivas y supervivencia.

No hay datos en la literatura respecto al significado pronóstico de la presencia de micrometástasis en la sangre periférica de los pacientes afectos de melanoma maligno de úvea. Sólo disponemos de un artículo<sup>253</sup> en el que se detectó en dos pacientes el ARNm de la tirosinasa mediante la RT-PCR en un total de 12 pacientes, uno de ellos al cabo de 12 meses desarrolló metástasis hepáticas.

En el caso del melanoma maligno cutáneo, la mayoría de autores determinan la presencia de micrometástasis en el momento del diagnóstico y lo relacionan con el estadio clínico, así como con el pronóstico<sup>123,165,231,164,233</sup>. Solamente en una publicación se ha determinado la presencia de células circulantes de melanoma en sangre periférica, de pacientes diagnosticados de melanoma con anterioridad, llegando a la conclusión que los que son positivos a la prueba presentan un mayor riesgo de recurrencia y muerte<sup>277</sup>.

En cuanto al tipo de tratamiento, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, respecto a la presencia de micrometástasis entre los casos tratados de forma conservadora mediante braquiterapia y el resto de tratamientos ( $p=0,614$ ), ni tampoco entre la enucleación y los demás

( $p=0,293$ ). Según estos resultados, la braquiterapia parece condicionar una tendencia a un porcentaje inferior de micrometástasis (3,2%) respecto a los otros tratamientos (9,1%). Algo parecido ocurre entre la enucleación y el resto de tratamientos. Entre los pacientes enucleados existe una proporción superior de detección de melanocitos circulantes (11,8%), respecto a los pacientes a los que se les ha aplicado otros tratamientos (4,3%). Estas tendencias no son valorables, puesto que, debido al bajo porcentaje de pacientes positivos a la PCR, estos no se han agrupado según su tamaño tumoral, y por lo tanto hemos sesgado con mucha probabilidad la selección. Ello es cierto en el caso de los tratamientos más radicales, como la enucleación, aplicados a los pacientes que presentaban tumoraciones más grandes, en cuyo caso es más probable que detectemos la presencia de melanocitos circulantes.

Respecto a las variables anatomo-patológicas no hemos conseguido relacionar ninguna de ellas con el resultado de la RT-PCR.

Hemos detectado una tendencia próxima a la significación estadística, en las tumoraciones con celularidad mixta, a presentar una mayor proporción de micrometástasis, respecto a los tumores de celularidad fusiforme y epiteliode ( $p= 0.079$ ). Clásicamente se ha relacionado el tipo celular con el pronóstico, de tal manera que aquellas lesiones de predominio epiteliode o mixto, presentaban un peor pronóstico.

No hemos podido relacionar otros factores pronósticos histopatológicos clásicos, ya sea la actividad mitótica, la presencia de linfocitos o el contaje de PCNA con el resultado de la RT-PCR.

Queda por determinar en próximas investigaciones, si la positividad mediante la RT-PCR permite detectar más precozmente la presencia de metástasis, respecto de las exploraciones convencionales, y por lo tanto diagnosticamos a estos pacientes en un estadio más precoz. O bien si este hecho, por si sólo constituye un factor clínico pronóstico, que implique un menor intervalo libre de enfermedad o una menor supervivencia global, independientemente de la presencia o no de metástasis clínicas. Tanto de una manera como otra, ello tiene gran trascendencia clínica, puesto que cada vez

disponemos de más protocolos de tratamiento de la enfermedad metastásica, o de aquellos pacientes que presenten factores clínicos o anatómo-patológicos que impliquen un peor pronóstico y que naturalmente se aplicarían a este subgrupo de pacientes. En el caso del melanoma maligno cutáneo se están utilizando tratamientos adyuvantes con interferon alfa-2b o con anticuerpos anti-GM2, que parece que pueden incrementar el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global de estos pacientes en estadios II y III.<sup>278,279,280</sup> Cuando nos centramos en el melanoma maligno de úvea, disponemos de varios protocolos, para el tratamiento de la enfermedad diseminada, mediante quimioembolización hepática con cisplatino<sup>281</sup>, quimioterapia sistémica con bleomicina, vincristina, lomustina, dacarbacina e interferon alfa-2b<sup>282</sup>, lobectomía hepática en lesiones localizadas y accesibles quirúrgicamente<sup>283</sup> Para conseguir este objetivo sería del todo necesario iniciar un protocolo para los pacientes afectados de esta tumoración en donde de manera seriada se fuese determinando en intervalos de seis meses la presencia o no de micrometástasis, ello probablemente nos permitiría resolver estas dudas.

Finalmente también hay que señalar que en la actualidad la RT-PCR es una técnica cualitativa y no cuantitativa, por lo que no podemos cuantificar el ARNm que determinamos en sangre periférica, la cual cosa nos permitiría extrapolar el número de células circulantes. Es probable que en un futuro inmediato, tengamos acceso a técnicas que nos permitan una cuantificación de los productos de la PCR.

## **8. CONCLUSIONES.**



Resumimos a continuación las conclusiones, que se derivan de este trabajo de investigación:

1. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) es útil para la determinación del ARNm codificado por el gen de la tirosinasa en sangre periférica, como indicador de la presencia de células tumorales circulantes. Hemos podido demostrar la elevada sensibilidad de esta técnica en la detección de células de melanoma maligno de úvea procedentes del cultivo de varias líneas celulares diluidas en muestras sanguíneas de células mononucleadas procedentes de pacientes sanos. En todas las líneas celulares la sensibilidad ha sido 1 célula entre  $10 \times 10^6$  células mononucleadas, lo que equivale a la detección de 1 célula en 5 cc. de sangre total. Uno de los factores que pueden haber influido en nuestros buenos resultados es la utilización de hexámeros al azar (Oligo p(N)<sub>6</sub>)

2. Cuando aplicamos ésta técnica a nuestra serie de pacientes, hemos podido demostrar cómo la presencia de células de melanoma maligno de úvea circulantes, era objetivable en una proporción de pacientes del 6,15%. No se ha evidenciado ningún falso positivo entre el grupo de pacientes sanos, por lo que la especificidad es del 100%.

3. La RT-PCR es una exploración que puede añadirse como prueba de rastreo de metástasis en pacientes afectos de melanoma maligno de úvea, puesto que cuando la prueba es negativa permite con gran seguridad descartar la presencia de enfermedad diseminada. En el caso de que un paciente sea positivo a la prueba, dependiendo de la clasificación del COMS (que tiene en cuenta exclusivamente el tamaño tumoral), mayor será su probabilidad de presentar enfermedad diseminada.

4. Hemos podido establecer relaciones clínicas entre factores pronósticos clínicos y la presencia de micrometástasis, como:

- la invasión de la raíz del iris
- la extensión tumoral al humor vítreo
- la base tumoral vertical
- el estado sistémico

- el tiempo de seguimiento

Finalmente, hay que señalar, que este trabajo de investigación nos permitirá incorporar en el seguimiento de nuestros pacientes, afectos de melanoma maligno de úvea, una prueba adicional en el rastreo de enfermedad metastásica.

Queda por determinar el significado pronóstico de la positividad mediante la RT-PCR, y si esta técnica nos diagnosticará más precozmente la enfermedad diseminada, respecto a las exploraciones complementarias clásicas (Radiografía de tórax, enzimas hepáticas y ecografía hepática).

## 9. BIBLIOGRAFIA



- 
- <sup>1</sup> Scotto J, Fraumeni JF, Lee JAH. Melanomas of the eye and other noncutaneous sites: epidemiologic aspects. *J Nat Cancer Inst* 1976;56:489-91.
- <sup>2</sup> Egan K, Seddon J, Glynn R et al. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmology* 1988;32:239-51
- <sup>3</sup> Jensen OA. Malignant melanoma of the human uvea: 25 years follow-up of cases in Denmark 1943-1952. *Acta Ophthalmol* 1982;60:161-82
- <sup>4</sup> Diener-West M, Hawkins B, Markowitz JA, Schachat AP. A review of mortality from choroidal melanoma. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1996 through 1988. *Arch Ophthalmol* 1992;110:245-50
- <sup>5</sup> Gamel JW, McLean IW, McCurdy JB. Biologic distinctions between cure and time to death in 2892 patients with intraocular melanoma. *Cancer* 1993;71:2299-305.
- <sup>6</sup> McLean IW. The biology of haematogenous metastasis in human uveal melanoma. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993;422:433-7
- <sup>7</sup> Tarin D, Price JE, Kettlewell MGW, et al.. Clinicopathological observations on metastases in man studied in patients treated with peritoneovenous shunts. *Br Med J* 1984;288: 749-51.
- <sup>8</sup> Christopherson W. Cancer cells in the peripheral blood: a second look. *Acta Cytolo* 1965;9:169-174
- <sup>9</sup> Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J Clin Oncol* 1990;8: 736-40.
- <sup>10</sup> Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
- <sup>11</sup> Sawyers CL, Timson L, Kawasaki ES, et al. Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:563-67.
- <sup>12</sup> Lyons J. Analysis of ras gene point mutations by PCR and oligonucleotide hybridization. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press 1990;386-91.
- <sup>13</sup> Luyten GPM, Van der Spek CW, Brand I, et al. Expression of MAGE, gp100 and tyrosinase genes in uveal melanoma cell lines. *Melanoma Research* 1998;8:11-6.
- <sup>14</sup> Brouwenstijn N, Slager EH, Bakker ABH, et al. Transcription of the gene encoding melanoma-associated antigen gp100 in tissues and cell lines other than those of the melanocytic lineage. *Br J Cancer* 1997; 76: 1562-6.

- 
- <sup>15</sup> Miller B, Abraham C, Cole GC, et al. Ocular malignant melanoma in South African Blacks. *Br J Ophthalmol* 1981;65:720-2
- <sup>16</sup> Templeton AC: Tumors of the eye and adnexa in Africans of Uganda. *Cancer* 1967;20: 1689-98
- <sup>17</sup> Malik MOA, El Sheikh EH. Tumors of the eye and adnexa in the Sudan. *Cancer* 1979;44:293-303
- <sup>18</sup> Strickland D, Lee JAH. Melanoma of eye: stability of rates. *Am J Epidemiol* 1981;113:700-2
- <sup>19</sup> Houghton A, Flannery J, Viola MV. Malignant melanoma in Connecticut and Denmark. *Int J Cancer* 1980;25:95-104.
- <sup>20</sup> Shamas HF, Watzke RC. Bilateral choroidal melanomas: case report and incidence. *Arch Ophthalmol* 1977;95:617-23
- <sup>21</sup> Birdsell JM, Gunther BK, Boyd TA, et al. Ocular melanoma: a population-based study. *Can J Ophthalmol* 1980;15:9-12.
- <sup>22</sup> Abrahamsson M. Malignant melanoma of the choroid and ciliary body 1956-1975 in Halland and gothenburg: incidence, histopathology and prognosis. *Acta Ophthalmol* 1983;61:600-10
- <sup>23</sup> Egan KM, Seddon J, Gragoudas ES, et al. Uveal melanoma in New England: profile of cases diagnosed in 1984 to 1985. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 1987;28:144.
- <sup>24</sup> Barr CC, McLean IW, Zimmerman LE. Uveal melanoma in children and adolescents. *Arch Ophthalmol* 1981;99:2133-6
- <sup>25</sup> Raivio I, Uveal melanoma in Finland: an epidemiological, clinical, histological and prognostic study. *Acta Ophthalmol (Suppl)* 1977;133:3-64.
- <sup>26</sup> Mork T. Malignant neoplasm of the eye in Norway: incidence, treatment and prognosis. *Acta Ophthalmol* 1961;38:824-31.
- <sup>27</sup> Yanoff M, Zimmerman LE. Histogenesis of malignant melanomas of the uvea. Relationship of uveal nevi to malignant melanoma. *Cancer* 1967;20:493-507.
- <sup>28</sup> Shamas HF, Blodi FC. Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:63-9
- <sup>29</sup> Klauss V, Chana HS. Ocular tumors in Africa. *Soc Sci Med* 1983;17:1743-50
- <sup>30</sup> Kuo PK, Puliafito CA, Wang KM, et al. Uveal melanoma in China. *Int Ophthalmol Clin* 1982;22:57-71.
- <sup>31</sup> Bettman JW Jr. Eye disease among American Indians of the Southwest. Overall analysis. *Arch Ophthalmol* 1972;88:263-8

- 
- <sup>32</sup> Tucker MA, Shields JA, Hartge P, et al. Sunlight exposure as a risk factor for intraocular malignant melanoma. *N Engl J Med* 1985;313:789-92.
- <sup>33</sup> Sahel JA, Pesavento R, Frederick AR et al. Melanoma arising de novo over a 16 months period. *Arch Ophthalmol* 1988;106:382-5
- <sup>34</sup> Gonder JR, Shields JA, Albert DM et al. Uveal malignant melanoma associated with ocular and oculodermal melanocytosis. *Ophthalmology* 1982;89:953-60
- <sup>35</sup> Velazquez N, Jose IS. Ocular and oculodermal melanocytosis associated with uveal melanoma. *Ophthalmology* 1983;90:1472-6
- <sup>36</sup> Reese AB. Tumors of the eye. New York, Hoeber 2ed 1963: 332-5
- <sup>37</sup> Gonder JR, Shields JA., Shakin JL, et al. Bilateral ocular melanocytosis with malignant melanoma of the choroid. *Br J Ophthalmol* 1981;65:843-5
- <sup>38</sup> Pomerantz GA, Bunt AH, Kalina RE. Multifocal choroidal melanoma in ocular melanocytosis. *Arch Ophthalmol* 1981;99:857-63.
- <sup>39</sup> Nick NA, Glew WB, Zimmerman LE. Malignant melanoma of the choroid in the nevus of Ota of a black patient. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1641-43
- <sup>40</sup> Albert DM, Chang MA, Lamping K et al. The dysplastic nevus syndrome. A pedigree with primary malignant melanoma of the choroid and skin. *Ophthalmology* 1985;92:1728-34.
- <sup>41</sup> Taylor MR, Guerry D, Bondi EE et al. Lack of association between intraocular melanoma and cutaneous dysplastic nevi. *Am J Ophthalmol* 1984;98:478-82.
- <sup>42</sup> van Hees CLM, de Boer A, Jager MJ, et al. Are atypical nevi a risk factor for uveal melanoma? A case-control study. *J Invest Dermatol* 1994;103:202-5
- <sup>43</sup> Hammer H, Tóth-Molnár E, Oláh J, Dobozy A. Cutaneous dysplastic naevi: risk factor for uveal melanoma. *Lancet* 1995;Jul 22;346(8969): 255-6
- <sup>44</sup> Wiznia RA, Freedman JK, Mancini AD et al. Malignant melanoma of the choroid in neurofibromatosis. *Am J Ophthalmol* 1978; 86: 684-7
- <sup>45</sup> Yanoff M, Zimmerman LE. Histogenesis of malignant melanoma of the uvea. III. The relationship of congenital ocular melanocytosis and neurofibromatosis to uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1967;77:331-6
- <sup>46</sup> Sinilikova OM, Egan KM, Quinn JL, et al. Germline BCRA2 sequence variants in patients with ocular melanoma. BCLC Meeting Dublin 1998. Abstract 14.5
- <sup>47</sup> RS Houlston, BE Damato. Genetic predisposition to ocular melanoma. *Eye* 1999; 13:43-6
- <sup>48</sup> Singh AD, Shields CL, De Potter P, Shields JA, et al. Familial uveal melanoma. Clinical observations on 56 patients. *Arch Ophthalmol* 1996;114: 392-9.

- 
- <sup>49</sup> Seddon JM, Mclaughlin DT, Albert DM et al. Uveal melanomas presenting during pregnancy and the investigation of oestrogen receptors in melanomas. *Br J Ophthalmol* 1982;66:695-704.
- <sup>50</sup> Shields JA, Augsburger JJ, Arbizo V et al. Malignant melanoma of the choroid in a husband and wife. *Br J Ophthalmol* 1984;68:623-5
- <sup>51</sup> El Baba F, Blumancranz M. Malignant melanoma at the site of penetrating ocular trauma. *Arch Ophthalmol* 1986;104:405-9
- <sup>52</sup> Vicary D. Malignant melanoma at the site of penetrating ocular trauma. *Arch Ophthalmol* 1986;104:1130.
- <sup>53</sup> Seddon JM, Albert DM, Lavin PT, Robinson N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1894-9.
- <sup>54</sup> Kath R, Hayungns J, Bornfeld N et al. Prognosis and treatment of disseminated uveal melanoma. *Cancer* 1993; 72: 2219-23
- <sup>55</sup> McLean IW, Ainsbinder DJ, Gamel JW, McCurdy JB. Choroidal-ciliary body melanoma. A multivariate survival analysis of tumor location. *Ophthalmology* 1995;102:1060-4.
- <sup>56</sup> McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* 1982;13:123-32.
- <sup>57</sup> Folberg R, Pe'er J, Gruman LM et al. The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression of primary human uveal melanoma: a matched case-control study. *Human Pathol* 1992;23:1298-305.
- <sup>58</sup> Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, et al. The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993;100:1389-98.
- <sup>59</sup> Luyten GPM, Mooy CM, Eijkenboom WMH, et al. No effect of pre-enucleation irradiation on survival of patients with uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1995;119:786-91.
- <sup>60</sup> Coleman K, Baak JPA, van Diest PJ, et al. Prognostic factors following enucleation of 111 uveal melanomas. *Br J Ophthalmol* 1993;77:688-92.
- <sup>61</sup> Augsburger JJ, Gamel JW. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;66:1596-600
- <sup>62</sup> Shields CL, Shields JA, Kiratli H, De Potter P, Cater J. Risk factors for growth and metastasis of small choroidal melanocytic lesions. *Ophthalmology* 1995;102:1351-61.
- <sup>63</sup> Callender GR. Malignant melanocytic tumors of the eye: A study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1931;36:131-42.

- 
- <sup>64</sup> McLean 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;96:502-9.
- <sup>65</sup> McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977;95:48-58
- <sup>66</sup> Rummelt V, Folberg R, Woolson RF et al. Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 1995;102:844-51.
- <sup>67</sup> Pe'er J, Rummelt V, Mawn L, et al. Mean of the ten largest nucleoli, microcirculation architecture and prognosis of ciliochoroidal melanomas. *Ophthalmology* 1994;101:1227-35.
- <sup>68</sup> Rummelt V, Folberg R, Rummelt C, et al. Microcirculation architecture of melanocytic nevi and malignant melanomas of the ciliary body and choroid, a comparative histopathologic and ultrastructural study. *Ophthalmol* 1994;101:718-27
- <sup>69</sup> Lattman J, Kroll S, Char DH et al. Cell cycling and prognosis in uveal melanoma. *Clin Canc Res* 1995;1:41-7
- <sup>70</sup> Mooy CM, Luyten GPM, Luider TM, et al. An immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* 1995;147:1097-104
- <sup>71</sup> Karlsson M, Boeryd B, Carstensen J, et al. DNA ploidy and S-phase fraction as a prognostic factors in patients with uveal melanoma. *Br J Cancer* 1995;71:177-81.
- <sup>72</sup> Rennie IG, Rees RC, Parsons MA, et al. Estimation of DNA content in uveal melanoma by flow cytometry. *Eye* 1989;3:611-7
- <sup>73</sup> Bardenstein DS, Char DH, Kaleta-Michaels S, Kroll SM. Ki-67 and bromodeoxyuridine labeling of human choroidal melanoma cells. *Curr Eye Res* 1991;10:479-84.
- <sup>74</sup> Mooy CM, de Jong PTVM, van der Kwast TH, et al. Ki-67 immunostaining in uveal melanoma: the effect of pre-enucleation radiotherapy. *Ophthalmology* 1990;97:1275-80
- <sup>75</sup> Pe'er J, Gnessin H, Shargal Y, Livni N. PC-10 immunostaining of proliferative cell nuclear antigen in posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 1994;101:56-62.
- <sup>76</sup> Sergard S, Oskarsson M, Spangberg B. PC-10 as a predictor after antigen retrieval in posterior uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1451-8
- <sup>77</sup> Ghazvini S, Kroll S, Char DH, Frigillana H. Comparative analysis of proliferating cell nuclear antigen, bromodeoxyuridine, and mitotic index in uveal melanoma. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 2762-7.

- 
- <sup>78</sup> Marcus DM, Minkovitz JB, Wardell SD, Albert DM. The value of nucleolar organizer regions in uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1990;110:527-34.
- <sup>79</sup> Gamel JW, McLean IW. Quantitative analysis of Callender's classification of uveal melanoma cells. *Arch Ophthalmol* 1977;95:686-91.
- <sup>80</sup> Gass JDM. Problems in the differential diagnosis of choroidal nevi and malignant melanomas. The XXXIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1977;83:299-323.
- <sup>81</sup> Seddon JM, Polivogianis L, Hsieh CC et al. Death from uveal melanoma. Number of epithelioid cells and inverse S.D: of nucleolar area as prognostic factors. *Arch Ophthalmol* 1987;105:801-6
- <sup>82</sup> Gamel JW, McLean IW, Greenberg RA et al. Computerized histologic assessment of malignant potential : a method for determining the prognosis of uveal melanoma. *Hum Pathol* 1982;13:893-7
- <sup>83</sup> Gamel JW, McLean IW, Greenberg RA et al. Objective assessment of the malignant potential of intraocular melanomas using standar H&E stained microslides. *Hum Pathol* 1985;16:689-92
- <sup>84</sup> Huntington A, Haugan P, Gamel J, McLean I. A simple cytological metod for predicting the malignant potential of intraocular melanoma. *Pathol Res Pract* 1989;185:631-4.
- <sup>85</sup> McCurdy J, Gamel J, McLean I: A simple, efficient and reproductible method for estimating the malignant potential of uveal melanoma from routine H&E slides. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 1025-7.
- <sup>86</sup> Mooy C, Vissers K, Mulder A et al. DNA flow cytometry in uveal melanoma: the effect of pre-enucleation radiotherapy. *Br J Ophthalmol* 1995;79: 174-7
- <sup>87</sup> Chen TC, Char DH, Waldman F, Fuster RP. Flow cytometry measurements of nuclear RNA content in uveal melanoma. *Ophthalmic Res.* 1990;22:187-93
- <sup>88</sup> Prescher G, Bornfeld N, Horsthemke B, Becher R. Chromosomal aberrations defining uveal melanoma of poor pognosis. *Lancet* 1992;339:691-2.
- <sup>89</sup> Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, et al. Pronostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-5
- <sup>90</sup> Sisley K, Rennie IG, Cottam DW, et al. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosome 3,6 and 8. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1990;2:205-9
- <sup>91</sup> Luyten GPM, Naus NC, Mooy CM et al. Establishment and characterization of primary and metastasic uveal melanoma cell lines. *Int J Cancer* 1996;66: 380-7.

- 
- <sup>92</sup> Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-48
- <sup>93</sup> Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor-suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
- <sup>94</sup> Srivastava S, Zou ZQ; Pirolo K, et al. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990;348:747-9.
- <sup>95</sup> Tobal K, Warren W, Cooper CS et al. Increased expression and mutation of p53 in choroidal melanoma. *Br J Cancer* 1992;66:900-4
- <sup>96</sup> Janssen K, Kuntze J, Busse H, Schmid KW. P53 oncoprotein overexpression in choroidal melanoma. *Mod Pathol* 1996;9:267-72.
- <sup>97</sup> Jay M, McCartney AC. Familial malignant melanoma of the uvea and p53: a Victorian detective story. *Surv Ophthalmol* 1993;37:457-62
- <sup>98</sup> Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7
- <sup>99</sup> Merbs SL, Sidransky D. Analysis of p16 (CDKN2/MTS-12/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma. *Inv Ophthalmol Visual Science* 1999; 40:779-83.
- <sup>100</sup> Chevenix-Trench G, Martin NG, Ellem KA. Gene expression in melanoma cell lines and cultured melanocytes: correlation between levels of c-src-1, c-myc and p53. *Oncogen* 1990;5:1187-93.
- <sup>101</sup> Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991; 64: 249-70.
- <sup>102</sup> Goldblatt SA, Nadel EM. Cancer cells in the circulating blood: a critical review II. *Acta Cytol* 1965;9:6-20
- <sup>103</sup> McGrew EA. Criteria for the recognition of malignant cells in circulating blood. *Acta Cytol* 1965;9:58-60.
- <sup>104</sup> Seal SH. A sieve for the isolation of cancer cells and other large cells from the blood. *Cancer* 1964;17:637-42.
- <sup>105</sup> Stanford GB. Malignant cells in the blood of eye patients. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngology* 1971;75:102-9
- <sup>106</sup> Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN, Romansky SG, Hammond GD, Seeger R. Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastasis in neuroblastoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 219-26.
- <sup>107</sup> Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J Clin Oncol* 1990;8:736-40.
- <sup>108</sup> Cho KH, Hashimoto K, Taniguchi Y, Immunohistochemical study of melanocytic nevus and malignant melanoma with monoclonal antibodies against S-100 subunits. *Cancer* 1990; 66:765-71.

- 
- <sup>109</sup> Walts AE, Said JW, Shintaku IP. Cytodiagnosis of malignant melanoma: immunoperoxidase staining with HMB-45 antibody as an aid to diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 77-80
- <sup>110</sup> Moul JW, Lewis DJ, Ross AA, Kahn DG, Ho CK, McLeod DG. Immunohistologic detection of prostate cancer pelvic lymph node micrometastasis: correlation to preoperative serum prostate-specific antigen. *Urology* 1994;43:68-73
- <sup>111</sup> Freeman JA, Esrig D, Grossfeld GD, Stein JP, Chen SC, Young LL. Incidence of occult lymph node metastases in pathological stage C (pT3 N0) prostate cancer. *J Urol* 1995;154: 474-8
- <sup>112</sup> Stahel RA, Mabry M, Skarkin AT, Speak J, Bernal SD. Detection of bone marrow metastases in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J Clin Oncol* 1985; 3: 455-61.
- <sup>113</sup> Pantel K, Izbicki J, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996; 347. 649-53
- <sup>114</sup> Schlimok G, Funke I, Bock B, et al. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1990; 8: 831-7.
- <sup>115</sup> Lindemann F, Schlimock G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; 340:685-9.
- <sup>116</sup> Redding WH, Monaghan P, Imrie SF, Ormerod MG, Gazet MG, Coombes RC et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983; 2: 1271-3.
- <sup>117</sup> Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, et al. The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* 1988;90:1-6.
- <sup>118</sup> Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factor for distant metastases. *J Clin Oncol* 1992;10: 1534-9.
- <sup>119</sup> Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4
- <sup>120</sup> Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Wittle ON, et al. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5698-702

- 
- <sup>121</sup> Blennerhassett GT, Furth ME, Anderson A, Burns JP, Changanti RS, Blick M et al. Clinical evaluation of a DNA probe assay for the Philadelphia (Ph1) translocation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1988;2:648-57
- <sup>122</sup> Roth MS, Terry VH. Application of the polymerase chain reaction for detection of minimal residual disease of hematologic malignancies. *Henry Ford Hosp Med J* 1991;39:112-6
- <sup>123</sup> Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227-9
- <sup>124</sup> Eisestein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322(3): 178-82
- <sup>125</sup> Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, freirreich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cell carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987;237:175
- <sup>126</sup> Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Weiss PD, Griffith RC, Korsmeyer SJ. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14:18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4869-73.
- <sup>127</sup> Gribben J, Nadler L. Detection of minimal residual disease. *Cancer Treat Res* 1995;76:249-70
- <sup>128</sup> Gabert J, Thuret I, Lafage M Carcassonne Y, et al. Detection of residual bcr/abl translocation by polymerase chain reaction in chronic myeloid leukaemia patients after bone-marrow transplantation. *Lancet* 1989;2:1125-8.
- <sup>129</sup> Westbrook CA. The role of molecular techniques in the clinical management of leukemia: lessons from the Philadelphia chromosome. *Cancer* 1992;70: 1695-700.
- <sup>130</sup> Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridation. *Science* 1990;250:559-62.
- <sup>131</sup> Moos M, Schulz R, Cremer F, et al. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in B cell malignancies. *Stem Cells* 1995;13(Suppl):42-51
- <sup>132</sup> Downig JR, Head DR, Parham DM, Douglas EC, Hulshof MG, Link MP et al. Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993;143:1294-300.
- <sup>133</sup> Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, Rowland JM, Biggs CA, Thomas G et al. Reverse transcriptase PCR amplification of EWS/FLI-1 fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol* 1993;2:147-57

- 
- <sup>134</sup> Argatoff LH, O'Connell JX, Mathers JA, Gilks CB, Sorensen PH. Detection of the EWS/WT1 gene fusion by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the diagnosis of intra-abdominal desmoplastic small round cell tumor. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:406-12.
- <sup>135</sup> Lonn U, Lonn S, Nilsson B, Stenkvist B. Prognostic value of erb-B and myc amplification in breast cancer imprints. *Cancer* 1995;75:2681-7.
- <sup>136</sup> Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith LE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
- <sup>137</sup> Brodeur MG, Seeger RC, Schwab M, et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4.
- <sup>138</sup> Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1985;313:1111-6.
- <sup>139</sup> Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu SH, Weinstein IB. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 1989;4:923-8
- <sup>140</sup> Boss JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan de Vries M, van Boom JH, van der EB AJ, et al. Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-7.
- <sup>141</sup> Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH, Dobrovic A. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. *Mol Med* 1995;1:789-94.
- <sup>142</sup> Inoue S, Nakao A, Kasai Y, harada A, Nonami T, Takagi H. Detection of hepatic micrometastasis in pancreatic adenocarcinoma patients by two-stage polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1995;85:626-30.
- <sup>143</sup> Namamoto S, Nakao A, Kasai Y, Harada A, Nonami T, Takagi H. Detection of ras gene mutations in perioperative peripheral blood with pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 793-7.
- <sup>144</sup> Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- <sup>145</sup> Zur Hausen H. viruses in human cancers. *Science* 1991; 254: 1167-73.
- <sup>146</sup> ShibataD, Cosgrove M, Arnheim N, Martin J, Martin SE. Detection of human papillomavirus DNA in fine needle aspirations of metastatic squamous cell carcinoma of the uterine cervix using the polymerase chain reaction. *Diagn Cytopathol* 1989;4:40-3.
- <sup>147</sup> Mvula M, Iwasaka T, Matsuo N, Nakao Y, Kaku T, Hachisuga T, et al. Detection of human papillomavirus types 16 and18 in primary and in metastatic lesions of cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1994; 53:156-60.

- 
- <sup>148</sup> Czegledy J, Iosif C, Hansson BG, Evander M, Gergeley L, Wadell G, Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer?. *Int J Cancer* 1995;64:211-5.
- <sup>149</sup> Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol* 1997;15:1008-12
- <sup>150</sup> Otsuki T, Kumar S, Ensoli B, Kingma DW, Dano T, Sterler-Stevenson M, et al. Detection of HHV-8/KSHV DNA sequences in AIDS-associated extranodal lymphoid malignancies. *Leukemia* 1996;10:1358-62.
- <sup>151</sup> Takeda S, Shibata M, Morishima T, Harada A, Nakao A, Takagi H et al. Hepatitis C virus infection in hepatocellular carcinoma: detection of plus-strand and minus-strand viral RNA. *Cancer* 1992; 70:2255-9.
- <sup>152</sup> Katz AE, Dvries GM, Begg MD. Enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen as an indicator of true pathologic stage in patients with prostate cancer. *Cancer* 1994;75:1642-8.
- <sup>153</sup> Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merio A, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996;271:659-62
- <sup>154</sup> Jonas S, Windeatt S, O-Boateng A, Fordy C, Allen-Mersh TG. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut* 1996;39:717-21.
- <sup>155</sup> Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996;68:739-43.
- <sup>156</sup> Doi F, Chi DD, Charuworn BB, Conrad AJ, Russel J, Morton DL, et al. Detection of beta-human chorionic gonadotropin mRNA as a marker for cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* 1996;65:454-9
- <sup>157</sup> Hoon DS, Sarantou T, Doi F, Chi DD, Charuworn BB, Conrad AJ, et al. Detection of metastatic breast cancer by beta-HCG polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1996;69:369-74.
- <sup>158</sup> Park JS, Chee YH, Namkoong SE, Han SK, Kim TE, Lee HY, et al. Human papillomavirus detection in cervical carcinoma tissues and paraaortic lymph nodes by the polymerase chain reaction. *Gynecol Oncol* 1994;53:344-51.

- 
- <sup>159</sup> Edamoto Y, Tani M, Kurata T, Abe K. Hepatitis C and B virus infections in hepatocellular carcinoma: analysis of direct detection of viral genome in paraffin embedded tissues. *Cancer* 1996;77:1787-91.
- <sup>160</sup> Brossart P, Keilholz U, Scheibenbogen C, Mohler T, Willhauck M, Hunstein W. Detection of residual tumor cells in patients with malignant melanoma responding to immunotherapy. *J. Immunother* 1994;15:38-41.
- <sup>161</sup> Brossart P, Schmier JW, Kruger S, Willhauck U, Scheibenbogen C, Mohler T, et al. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 1995;55:4065-8.
- <sup>162</sup> Kunter U, Buer J, Probst M, Duensing S, Dullman I, Grosse J, et al. Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:590-4.
- <sup>163</sup> Stevens GL, Scheer WD, Levine EA. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:293-6.
- <sup>164</sup> Battayanni Z, Grob JJ, Xerri L, Noe C, Zarour H, Houvaenaghel G et al. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol* 1995;131:443-7.
- <sup>165</sup> Hoon Ds, Wang Y, Dale PS, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. *J Clin Oncol* 1995;13:2109-16.
- <sup>166</sup> Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, et al. Detection of micrometastatic cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer res* 1993; 53:5350-4.
- <sup>167</sup> Edelstein RA, Krane RJ, Babayan RK, de las Morenas, Moreland RB. A rapid and simple method for the detection of prostate-specific antigen mRNA in archival tissue specimens using a reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Urology* 1995;45:597-603.
- <sup>168</sup> Edelstein RA, Zietman A, De las Morenas A, Krane RJ, Babayab RK et al. Implications of prostatic micrometastases to the pelvic lymph nodes: first report of an archival tissue gene expression study. *J Urol* 1996;155:550.
- <sup>169</sup> Bretten PR, Melamed MR, Fair WR, Cote RJ. Detection of occult micrometastases in the bone marrow of patients with prostate cancer. *Cancer* 1991; 68:1895-8.
- <sup>170</sup> Wood DP, Weinstein M, Humphreys S, Rangnekar VM. Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer* 1994;74:2533-40.

- 
- <sup>171</sup> Kvalheim G. Detection of occult tumour cells in bone marrow and blood in breast cancer patients: methods and clinical significance. *Acta Oncol* 1996;35(Suppl 8):13-8
- <sup>172</sup> Deguchi T, Yang M, Ehara H, Ito S, Nishino Y, Takahashi Y, et al. Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the bone marrow of patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 1997;75:634-8.
- <sup>173</sup> Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancer and urine samples. *Science* 1991;252:706-9.
- <sup>174</sup> Nollau P, Moser C, Weinland G, Wagener C. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int J Cancer* 1996;66:332-6.
- <sup>175</sup> Davidson LA, Jiang YH, Lpton JR, Chapkin RS. Noninvasive detection of putative biomarkers for colon cancer using fecal messenger RNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:643-7.
- <sup>176</sup> Yakubovskaya MS, Spiegelman V, Luo FC, Malaev S, Slanev A, Zobrovskaya I, et al. High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 1995;63:810-4.
- <sup>177</sup> Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J, Walsh MD, Bates P, Simmons DL, et al. The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 1996;13:787-95
- <sup>178</sup> Carpenter KM, Durrant LG, Morgan K, Bennett D, Hardcastle JD, Kalsheker NA. Greater frequency of K-ras Vol-12 mutation in colorectal cancer as detected with sensitive methods. *Clin Chem* 1996;42:904-9.
- <sup>179</sup> Carrithers SL, Barber MT, Biswas S, Parkinson SJ, Park PK, Golsdtein SD, et al. Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14827-32
- <sup>180</sup> Gunn J, McCall JL, Yun K, Wright PA. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K 20 reverse transcription polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996;75:611-6
- <sup>181</sup> Junhl H, Roder C, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin 20 specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996;69:278-82.

- 
- <sup>182</sup> Funaki NO, Tanaka J, Itami A, Kasamatu T, Oshio G, Onodera H et al. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997;60:643-52.
- <sup>183</sup> Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725-9.
- <sup>184</sup> Karttunen TJ, Genta RM, Yoffe B, Hachem CY et al. Detection of helicobacter pylori in paraffin-embedded gastric biopsy specimens by in situ hybridation. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:305-11.
- <sup>185</sup> Fidalgo PO, Cravo ML, Chaves PP, Leitao CN, Mira FC. High prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and matched normal esophageal mucosa: assessment by polymerase chain reaction. *Cancer* 1995;76:1522-8.
- <sup>186</sup> Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H, Aihara T, Kasugai T, Tamura S et al. Detection of gastric cancer micrometastases in lymph nodes by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:650-4.
- <sup>187</sup> Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Arian K, Nakamura M, et al. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues. *J Surg Oncol* 1996;63:234-9.
- <sup>188</sup> Funaki NO, Tanaka J, Kasamatsu T, Oshio G, Hosotani R, Okino T et al. Identification of carcinoembryonic antigen mRNA in circulating peripheral blood of pancreatic carcinoma and gastric carcinoma patients. *Life Sci* 1996;59:2187-99.
- <sup>189</sup> Komeda T, Fukuda Y, Sando T, Kita R, Furukawa M, Nishida N et al. Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. *Cancer* 1995; 75: 2214-9
- <sup>190</sup> Matsumura M, Niwa Y, Hikiba Y, Imamura M, Kato N, Shiina S, et al. Sensitive assay for detection of hepatocellular carcinoma associated gene transcription (alpha-fetoprotein mRNA) in blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:813-8
- <sup>191</sup> Funaki NO, Tanaka J, Seto SI, Kasamatsu T, Kaido T, Imamura M. Hematogenous spreading of hepatocellular carcinoma cells: possible participation in recurrence in the liver. *Hepatology* 1997;25:564-8.
- <sup>192</sup> Niwa Y, Matsumura M, Shiratori Y, Inamura M, Kato N, Shinma P, et al. Quantification of alpha-fetoprotein and albumin messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;23:1384-92

- 
- <sup>193</sup> Smith VTHB, Boot AJ, Smits AMM, Fleuren GJ, et al. K-ras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinoma. *Nucleic Acids Res* 1988;16: 7773-82.
- <sup>194</sup> Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, et al. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53: 2472-4.
- <sup>195</sup> Miyamoto H, Kubota Y, Shuin T, Toirgoe S, Hosaka M, Iwasaki Y et al. Analyses of p53 gene mutations in primary human bladder cancer. *Oncol Res* 1993;5:245-9
- <sup>196</sup> Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y, Kubota Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer* 1995;71:831-5.
- <sup>197</sup> Burchill SA, Bradbury MF, pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71:278-81.
- <sup>198</sup> Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mull-holland SG et al. Detection of hematogenous micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992;2:6110-2.
- <sup>199</sup> Ghossein RA, Rosai J. Polimerase chain reaction in the detection of micrometastase and circulating tumor cells. *Cancer* 1996;78:10-6
- <sup>200</sup> Gann PH, Hennekens CH, Stampher MJ. A prospective evaluation of plasma prostate specific antigen for detection of prostate cancer. *JAMA* 1995;273:289-94.
- <sup>201</sup> Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal Je, Freiha FS, Redwine E. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New Engl J Med* 1987;317:9911-6.
- <sup>202</sup> Hall MC, Navone NM, Troncoso P, Pollack A, Zagars GK et al. Frequency and characterization of p53 mutations in clinically localized prostate cancer. *Urology* 1995;45:470-5
- <sup>203</sup> Ellis WJ, Vesella RL, Corey E. Use of a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect prostate cancer cells in the blood. *J Urol* 1996;155:378.
- <sup>204</sup> Gomella LG, Raj GV, Moreno Jg. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer. *J Urol* 1997;158:326-7.
- <sup>205</sup> Katz AE, De Vries GM, Olsson CA, Benson MC, et al. Molecular staging of genitourinary malignancies. *Urology* 1996; 47:948-58.
- <sup>206</sup> Ignatoff JM, Oelfelein MG, Herz B, Watkin B, Kaul KL. Prostate specific antigen (PSA) reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in preoperative staging of prostate cancer. *J Urol* 1996;155:417A.

- 
- <sup>207</sup> Dumas F, Eschwege P, Blanchet P. Enhanced detection of hematogenous circulating prostatic cells in patients with prostate adenocarcinoma using prostate specific membrane antigen (PSMA) based nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *J Urol* 1996;155:506A.
- <sup>208</sup> Israeli RS, Miller WH, Su SL, Samadi DS, et al. Sensitive detection of prostatic hematogenous tumor cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *J Urol* 1995;153:573-7
- <sup>209</sup> Heston WD. Detection of hematogenous dissemination of prostatic cancer by RT-PCR with primers specific for prostate-specific membrane antigen (editorial) *Clin Chem* 1995;41:1687-8.
- <sup>210</sup> Amoils KD, Seymour L, Bezwoda WR. Comparison between immunocytochemical and polymerase chain reaction techniques for detection of estrogen receptor and transforming growth factor beta in breast cancer. *Br J Cancer* 1996;73:1225-9.
- <sup>211</sup> Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:475-82.
- <sup>212</sup> Smith MR, Biggar S, Hussain M. Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases. *Cancer Res* 1995;55:2640-4.
- <sup>213</sup> Beckman MW, Picard F and HX, van Roeyen CR, Dominick SI, Mosny DS et al. Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BCRA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996;73:1220-6
- <sup>214</sup> Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnet HD, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1994;54:2986-90.
- <sup>215</sup> Kruger W, Krzizanowsky C, Holweg M, Kruger WH, et al. Reverse transcriptase /polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:679-86.
- <sup>216</sup> Moscinski LC, Trudeau WL, Fields KK, Effenbein GJ. High sensitivity detection of minimal residual breast carcinoma using the polymerase chain reaction and primers for cytoqueratin 19. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:173-80
- <sup>217</sup> Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J, Tahara H, Buley I, Manek S et al. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: Diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int J Cancer* 1996; 69:301-6

- 
- <sup>218</sup> Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB. Analysis of detection of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med virol* 1994;44:206-11
- <sup>219</sup> de Roda Husman AM, Snijders PJ, Stel HV, van der Brule AJ, et al. Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;72:412-7
- <sup>220</sup> Franco E, Bergeron J, Villa L, Arella M, Richardson L et al. Human papillomavirus DNA in invasive cervical carcinomas and its association with patient survival: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:271-5
- <sup>221</sup> Pekonen F, Nyman T, Ammala M, Rutanen EM. Decreased expression of messenger RNAs encoding endothelin receptors and neutral endopeptidase 24.11 in endometrial cancer. *Br J Cancer* 1995;71:59-63.
- <sup>222</sup> Kuroda T, Saeki M, Nakano M, Mizutani S. Clinical application of minimal residual neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Pediatr Surg* 1997;32:69-72.
- <sup>223</sup> Mattano LA Jr., Moss TJ, Emerson SG. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52:4701-5
- <sup>224</sup> Brodeur GM. Clinical significance of genetic rearrangements in human neuroblastoma. *Clin Chem* 1989;35:B38-42
- <sup>225</sup> Adams V, Hany MA, Schmid M, Hassam S, et al. Detection of t(11;22) (q24;Q12) translocation breakpoint in paraffin-embedded tissue of the ewing's sarcoma family by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:107-13
- <sup>226</sup> Moos M, Schulz R, Cremer F, Sucker C, et al. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in B cells malignancies. *Stem Cells* 1995;13(suppl 3)42-51.
- <sup>227</sup> Miyajima Y, Kato K, Numata S, Kudo K, Horibe K. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for Tyrosine Hydroxylase mRNA. *Cancer* 1995;75:2757-61
- <sup>228</sup> Norris MD, Gilbert GY, Marshall GM, Haber M. Detection of minimal residual neuroblastoma by reverse transcription polymerase chain reaction. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994;35:1218
- <sup>229</sup> Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 1995;72:268-76.

- 
- <sup>230</sup> Burchill SA, Bradbury FM, Lewis IJ. Early clinical evaluation of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for tyrosine hydroxylase. *Eur J Cancer* 1994;31:553-6
- <sup>231</sup> Brossart P, Keilholz U, Willhauck M, et al. Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J Invest Dermatol* 1993;101:887-9.
- <sup>232</sup> Foss AJE, Guille MJ, Occlleston NL, Hykin PG, Hungerford JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;72:155-9.
- <sup>233</sup> Mellado B, Colomer D, Castel T, Muñoz M, Carballo E, et al. Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis. *J Clin Oncol* 1996;14:2091-7
- <sup>234</sup> Pittman K, Burchill S, Smith B, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* 1996;7:297-301.
- <sup>235</sup> Tessier MH, Denis MG; Lustenberg P, Dreno B. Detection of circulating neoplastic cells by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in melanoma. *Ann Dermatol Venereol* 1997;124:607-11.
- <sup>236</sup> Reintgen DS, Conrad AJ. Detection of occult melanoma cells in sentinel lymph nodes and blood. *Semin Oncol* 1997;24(suppl 4):S4-11-15
- <sup>237</sup> Reinhold U, Lütke-Handjery H, Schnautz S, et al. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J Invest Dermatol* 1997;108:166-9.
- <sup>238</sup> Sarantou T, Chi DD, Garrison DA, Conrad AJ, et al. Melanoma-associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma. *Cancer research* 1997;57:1371-6
- <sup>239</sup> Gläser R, Rass K, Seiter S, Hauschild A, et al. Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two center study. *J Clin Oncol* 1997;15:2818-25.
- <sup>240</sup> Jung FA, Buzaid AC, Ross MI, et al. Evaluation of tyrosinase mRNA as a tumor marker in the blood of melanoma patients. *J Clin Oncol* 1997;15, 2826-31.
- <sup>241</sup> Goydos JS, Ravikumar TS, Germino FJ, Yudd A, Bancila E. Minimally invasive staging of patients with melanoma: sentinel lymphadenectomy and detection of the melanoma-specific proteins MART-1 and tyrosinase by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Am Coll Surg* 1998;187:188-90.

- 
- <sup>242</sup> Blaheta HJ, Schittek B, Breuninger H, Maczey E, et al. Lymph node micrometastases of cutaneous melanoma: increased sensitivity of molecular diagnosis in comparison to immunohistochemistry. *Int J Cancer* 1998;79:318-23.
- <sup>243</sup> Farthmann B, Eberle J, Krasagakis K, Gstöttner M, et al. RT-PCR for tyrosinase -mRNA- Positive cells in peripheral blood: evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients. *J Invest Dermatol* 1998;110:263-7
- <sup>244</sup> Carrilo E, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, et al. Optimization of the tyrosinase mRNA probe to detect circulating melanocytes with reverse transcription and polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol* 1998;44:1247-52.
- <sup>245</sup> Curry BJ, Myers K, Hersey P. Polymerase chain reaction detection of melanoma cells in the circulation: relation to clinical stage, surgical treatment, and recurrence from melanoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1760-9.
- <sup>246</sup> Shivers SC, Wang X, Li W, Joseph E, et al. Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. *JAMA* 1998;280:1410-5.
- <sup>247</sup> O'Connell Cd, Juhasz A, Kuo C, Reeder DJ, Hoon DS. Detection of tyrosinase mRNA in melanoma by reverse transcription-PCR and electrochemiluminescence. *Clin Chem* 1998;44:1161-9
- <sup>248</sup> Sardi I, Moretti S, Ponchietti R, et al. The role of the detection of hematogenous micrometastasis in prostate adenocarcinoma and malignant melanoma by RT-PCR. *Int J Mol Med* 1999;3:417-9.
- <sup>249</sup> Le Bricon T, Stoitchkov K, Letellier S, et al. Simultaneous analysis of tyrosinase mRNA and markers of tyrosinase activity in the blood of patients with metastatic melanoma. *Clin Chim Acta* 1999;282:101-13.
- <sup>250</sup> Bieligk SC, Ghossein R, Bhattacharya S, Coit DG. Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 1999;6:232-40.
- <sup>251</sup> Waldmann V, Deichmann M, Bock M, Jackel A, Naher H. The detection of tyrosinase-specific mRNA in bone marrow is not more sensitive than in blood for the demonstration of micrometastatic melanoma. *Br J Dermatol* 1999;140:1060-4.
- <sup>252</sup> Tobal K, Sherman LS, Foss AJE, Lightman SL. Detection of melanocytes from uveal melanoma in peripheral blood using the polymerase chain reaction. *Inves Ophthal&Vis Scien* 1993;34:2622-5.

- 
- <sup>253</sup> El-Shabrawi, Langmann G, Hutter H, Kenner Hoefler G. Comparison of current methods and PCR for the diagnosis of metastatic disease in uveal malignant melanoma. *Ophthalmologica* 1998;212:80
- <sup>254</sup> Winder A, Kobayshi T, Tsukamoto K, Urabe K, Aroca P, et al. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:613-23.
- <sup>255</sup> Eisen T. The control of gene expression in melanocytes and melanomas. *Melanoma Res* 1996; 6: 277-84.
- <sup>256</sup> Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338: 1227-9.
- <sup>257</sup> De Waard-Siebinga I, Blom DJR, Griffioen M, et al. Establishment and characterization of an uveal-melanoma cell line. *Int J Cancer* 1995;62:155-61.
- <sup>258</sup> Boyun A Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand Clin Invest* 1968;21:51-5.
- <sup>259</sup> Chomckzynski P. y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- <sup>260</sup> Cross N, Hughes TP, Feng L, et al. Minimal residual disease after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br J Haematology* 1993;84:67-74
- <sup>261</sup> Pozo Rodriguez F. La eficacia de las pruebas diagnósticas(I). *Med Clin* 1988;90:779-85
- <sup>262</sup> Pozo Rodriguez F. La eficacia de las pruebas diagnósticas(II). *Med Clin* 1988,91:177-83
- <sup>263</sup> Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use and article about a diagnostic test. *JAMA* 1994;271: 703-7
- <sup>264</sup> Ghossein RA, Rosai J. Polimerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* 1996; 78:10-6
- <sup>265</sup> Glaves D. Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases. *Br J Cancer* 1983;48:665-73
- <sup>266</sup> Mayhew E, Glaves D. Quantitation of the tumorigenic disseminating and arrested cancer cells. *Br J Cancer* 1984;50:159-66.
- <sup>267</sup> Zimmerman LE, mcLean IW, Foster WD. Statistical analysis of follow-up data concerning uveal melanomas, and the influence of enucleation. *Ophthalmology* 1980;76:557.
- <sup>268</sup> Shields JA, Shields CL, Donoso LA. Mangement of posterior uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1991, 36: 161

- 
- <sup>269</sup> Dorland WA. En: Dorland's Illustrated Medical Dictionary. Philadelphia, W.B. Saunders Co, 1965.
- <sup>270</sup> Fidler IJ. The biology of human cancer metastasis. *Acta Oncol* 1991; 30:669-75.
- <sup>271</sup> Liotta LA, Steeler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991;51(suppl):5054-9
- <sup>272</sup> Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982;217:998-1001.
- <sup>273</sup> Fidler IJ. Macrophages and metastasis: a biological approach to cancer therapy. *Cancer Res* 1985;45 4714-26
- <sup>274</sup> Rennie IG. Uveal melanoma: tumor phenotype and metastatic potential. *Eye* 1997;11: 239-42.
- <sup>275</sup> Delage R, Soiffer RJ, Dear K, Ritz J. Clinical significance of bcr-abl gene rearrangement detected by polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1991; 78: 2759-67.
- <sup>276</sup> Hillaire S, Barbu V, Boucher E, Moukhtar M, Poupon R. Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1994; 106:239-42.
- <sup>277</sup> Mellado B, Gutierrez L, Castel T, Colomer D, et al. Prognostic significance of the detection of circulating malignant cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in long-term clinically disease-free melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1843-8.
- <sup>278</sup> Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, et al. Interferon  $\alpha$ -2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 1996;14:7-17
- <sup>279</sup> Efficacy, safety and risk-benefit analysis of adjuvant interferon alfa-2b in melanoma. Kirkwood JM, Resnick GD, Cole BF. *Semin Oncol* 1997;24 Suppl 4: S4-16-S4-23.
- <sup>280</sup> Livingston PO, Wong GYC, Adluris S, Tao Y, et al. Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies, A randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1036-44.
- <sup>281</sup> Bedikian AY, Legha SS, Mavligit G, et al. Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver: A review of the M. D. Anderson Cancer Center experience and prognostic factors. *Cancer* 1995;1: 1665-70.
- <sup>282</sup> Nathan FE, Sato T, Berd D and Mastrangelo MJ. BOLD + interferon; effective systemic therapy for metastatic uveal melanoma. *Proc ASCO* 1995; 14:410.

---

<sup>283</sup> Kath R, Hayungs J, Bornfeld N, et al. Prognosis and treatment of disseminated uveal melanoma. *Cancer* 1993; 72: 2219-23.