

11234



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

**“PROLIFERACION CELULAR Y APOPTOSIS EN TUMORES
PIGMENTADOS DE LA CONJUNTIVA.”**

T É S I S
QUE REALIZÓ PARA OBTENER EL TÍTULO DE POSGRADO EN
LA ESPECIALIDAD DE:

OFTALMOLOGIA

P R E S E N T A
DR. JOSE LUIS DIAZ RUBIO.

ASESOR:

DR. ABELARDO RODRIGUEZ REYES
JEFE DEL SERVICIO DE PATOLOGIA OCULAR
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO I.A.P
HOSPITAL “DR. LUIS SANCHEZ BULNES”

COASESORES:

DRA. PATRICIA NAVARRO LOPEZ
ADSCRITO AL SERVICIO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS
OCULARES. ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO
I.A.P HOSPITAL “DR. LUIS SANCHEZ BULNES”

DR. DANIEL OCHOA CONTRERAS
JEFE DE ENSEÑANZA
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO I.A.P
HOSPITAL “DR. LUIS SANCHEZ BULNES”

CD. DE MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2005.

m348100



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO I.A.P
HOSPITAL "DR. LUIS SANCHEZ BULNES"

"PROLIFERACION CELULAR Y APOPTOSIS EN TUMORES
PIGMENTADOS DE LA CONJUNTIVA."

TESIS DE POSGRADO

QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA

EN OFTALMOLOGIA

DR. JOSE LUIS DIAZ RUBIO.

ASESORES:

DR. ABELARDO RODRIGUEZ REYES

DRA. PATRICIA NAVARRO LOPEZ

DR. DANIEL OCHOA CONTRERAS.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

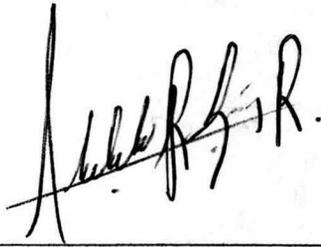
NOMBRE: José Luis Díaz
Rubio

FECHA: 20-09-05

FIRMA: [Firma manuscrita]

México, D.F.

SEPTIEMBRE 2005



DR. ABELARDO RODRIGUEZ REYES
JEFE DEL SERVICIO DE PATOLOGIA OCULAR
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO I.A.P
HOSPITAL "DR. LUIS SANCHEZ BULNES"



DRA. PATRICIA NAVARRO LOPEZ
ADSCRITO AL SERVICIO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS
OCULARES. ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO
I.A.P HOSPITAL "DR. LUIS SANCHEZ BULNES"



DR. DANIEL OCHOA CONTRERAS
JEFE DE ENSEÑANZA
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO I.A.P
HOSPITAL "DR. LUIS SANCHEZ BULNES"



SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
P.N.A.M.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS.

Por apoyarme en todo y
en cada momento de mi vida
por difíciles que sean.

A MI ESPOSA

Por amarme y acompañarme
Siempre en las alegrías y en
las penas, los gozos y las
dificultades. **Te amo.**

A MIS PADRES

Por darme la vida, educarme y guiarme por un buen camino.
A mi papa que con su fortaleza y amor me demostró que
hay que tener fuerza por sinuosos que sean los caminos.
A mi mama que este año dejo de estar con nosotros,
por entregarme tanto amor y cariño.

A MIS HERMANOS

Por motivarme siempre, por
Apoyarme y ayudarme en los
momentos difíciles

A MIS MAESTROS

Que con sus enseñanzas y consejos me han ayudado
a ser una mejor persona cada día

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Por su amistad incondicional
y su apoyo en todo momento

INDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	3
PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
JUSTIFICACION.....	7
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS.....	10
SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	12
VARIABLES	13
ANALISIS ESTADISTICO	15
RIESGOS Y BENEFICIOS	16
CONSIDERACIONES ETICAS.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSIONES.	18
CONCLUSIONES.	22
REFERENCIA.	23
TABLAS.	28
FIGURAS.....	32

RESUMEN.

“PROLIFERACION CELULAR Y APOPTOSIS EN TUMORES PIGMENTADOS DE LA CONJUNTIVA.”

Díaz-Rubio José Luis, Rodríguez-Reyes Abelardo,
Navarro-López Patricia, Ochoa-Contreras Daniel.

**ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO
I.A.P HOSPITAL “DR. LUIS SANCHEZ BULNES”**

Objetivo: Analizar la expresión de las proteínas PCNA, p53 y bcl-2 en la secuencia melanosis adquirida primaria (MAP)-Melanoma conjuntival.

Material y Métodos: Se investigó la expresión de las proteínas PCNA, p53 y bcl-2 mediante estudio de inmunohistoquímica en cuatro casos de MAP y cinco casos de melanomas conjuntivales de los archivos de Patología oftálmica de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, Hospital “Dr. Luis Sánchez Búlnes”. Se realizó un análisis cuantitativo de las células positivas para los diversos marcadores presentes en los diversos tejidos de los diferentes casos.

Resultados: Se demostró una relación entre la sobre-expresión del factor de proliferación celular (PCNA) y el grado de malignidad de las lesiones, siendo mayor la expresión en los casos de melanoma conjuntival en comparación con los casos benignos de MAP. El 60% de los casos de melanoma conjuntival mostraron una expresión positiva para p53 mientras que todos los casos de MAP fueron negativos. Por último la proteína anti-apoptótica bcl-2 no se encontró alterada en ninguno de los casos.

Conclusiones: La alteración de la vía de p53 participa de forma importante en el desarrollo de la secuencia MAP-Melanoma conjuntival lo que contribuye a un incremento en la proliferación celular.

Palabras clave: Melanoma, conjuntiva, inmunohistoquímica, bcl-2, p53 y PCNA

INTRODUCCION

El melanoma conjuntival es un tumor poco frecuente que tiene una alta tasa de recurrencia y una mortalidad de hasta un 30%. De forma interesante el 75% de los melanomas conjuntivales se originan a partir de una melanosis adquirida primaria (MAP). Dentro de los casos de MAP se postula que solo aquellos con cambios celulares atípicos tienen potencial de transformación maligna hasta un 46.4%. (1, 2). Este hecho constituye una base importante para el estudio de los eventos moleculares que acontecen en la transformación de un tumor benigno a uno maligno.

Actualmente una neoplasia puede definirse como una desregulación de la homeostasis tisular ocasionada por un desequilibrio entre diversos eventos celulares, dentro de los cuales sobresalen la proliferación y muerte celular (3). La proliferación de las células normales está regulada por moléculas de control estimuladoras e inhibitoras, correspondientes respectivamente a proto-oncogenes y genes supresores de tumores.

El gen p53, gen supresor tumoral, codifica para una fosfoproteína nuclear cuya función es frenar el crecimiento celular indiscriminado de una célula tumoral mediante la inducción de apoptosis (4). La mutación o pérdida del gen p53 es la alteración genética encontrada de forma más frecuente en el cáncer humano, y tiene como consecuencia la proliferación acentuada de las células tumorales sin la capacidad de freno o de inducción de muerte celular programada. (5, 6). La forma natural de la proteína p53, debido a su corta vida media, no es detectable en

tejidos normales. Sin embargo, la mutación del gen incrementa los niveles de proteína mediante un mecanismo de estabilización post-traducciona, lo que permite la detección mediante inmunohistoquímica de la proteína p53 mutada, siendo el patrón de tinción nuclear el más frecuentemente observado, aunque también se ha reportado un patrón citoplasmático en otro tipo de tumores (7).

El gen *bcl-2* es considerado un proto-oncogén que codifica para una proteína con potencial anti-apoptótico (8). Al aumentar la supervivencia de una célula tumoral, mediante la inhibición de la apoptosis, *bcl-2* incrementa el riesgo de exposición celular a otras mutaciones que conlleven a un círculo vicioso con la consecuente formación de un tumor maligno (9). La sobre-expresión de esta proteína detectada por inmunohistoquímica es un evento importante en diversas neoplasias cuyas células mutadas presentan un patrón de tinción citoplasmático (10).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una molécula de 36-kDa que funciona como molécula accesoria del ADN polimerasa y que se requiere en el proceso de síntesis del ADN en la fase S del ciclo celular. El PCNA se asocia fuertemente a regiones donde está ocurriendo síntesis de ADN y se correlaciona con otros marcadores de proliferación celular como el Ki67 y mitosis, expresándose en células que se encuentran en proliferación activa (11). Se ha encontrado que la reacción de inmunohistoquímica con este marcador es útil en la predicción de agresividad en algunos tumores con una tasa proliferativa alta (12).

En los últimos años, la caracterización de los mecanismos moleculares que suceden en la patogénesis de los melanomas del humano han dado pauta a la identificación de nuevos blancos terapéuticos y nuevos factores pronósticos principalmente a nivel cutáneo (13) y más precariamente a nivel ocular, de forma específica en melanomas coroideos (14). Sin embargo hasta este momento se desconocen los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo secuencial de una MAP con atipia a un agresivo melanoma conjuntival. En el presente estudio se analizaron mediante técnicas de inmunohistoquímica la expresión de las proteínas PCNA, p53 y bcl-2 en una serie de tumores melanocíticos conjuntivales benignos (MAP) y malignos (melanomas).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hasta el momento actual se desconoce la existencia de alteraciones en genes clave que participan en el control de la proliferación celular y apoptosis tales como p53, bcl-2 y PCNA en la secuencia melanositis adquirida primaria-melanoma conjuntival.

JUSTIFICACIÓN.

El cáncer es un fenómeno biológico complejo y secuencial en el que una serie de mutaciones son necesarias para la transformación maligna desde un tejido normal. Dado que la mayor parte de los melanomas conjuntivales se originan de lesiones pre-malignas (MAP) o benignas (nevos) este tumor constituye un excelente modelo de estudio para analizar los eventos celulares y moleculares que intervienen en la transformación de lesiones benignas a tumores malignos.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS ALTERNA:

Existe una alteración secuencial en la expresión del gen p53, bcl-2 y PCNA en la cascada conjuntival melanosis adquirida primaria-melanoma conjuntival. Dicha alteración en la expresión de p53, bcl-2 y PCNA varía dependiendo del tipo de lesión conjuntival presente.

HIPÓTESIS NULA:

No existe una alteración secuencial en la expresión del gen p53, bcl-2 y PCNA en la cascada conjuntival-melanosis adquirida primaria-melanoma conjuntival. Dicha alteración en la expresión de p53, bcl-2 y PCNA no varía dependiendo del tipo de lesión conjuntival presente.

OBJETIVOS.

OBJETIVOS .

1. PRIMARIO:

Se estudio la expresión del gen p53, bcl-2 y PCNA en lesiones conjuntivales con diagnóstico histopatológico de melanosis adquirida primaria y melanoma conjuntival.

2. SECUNDARIO:

Se evaluó la asociación entre la expresión de dichos genes y las características clínicas de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS.

METODOLOGIA

DISEÑO DEL ESTUDIO

De los archivos del Servicio de Patología Oftálmica de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México (APEC), se revisaron de manera retrospectiva y aleatoria, casos con diagnóstico histopatológico de MAP y/o melanoma conjuntival, para la realización de estudio de inmunohistoquímica de la expresión de los genes p53, bcl-2 y PCNA con anticuerpos monoclonales.

Los tumores fueron divididos en casos de MAP con atíпия y/o melanoma conjuntival según las características histopatológicas del tejido analizado.

GRUPO 1. Pacientes con MAP con atíпия.

GRUPO 2. Pacientes con melanoma conjuntival

La información demográfica y clínica de los pacientes incluidos en el estudio se obtuvo de manera retrospectiva de los libros del Servicio de Patología Oftálmica. Se analizaron los siguientes datos: género, edad y ojo afectado.

UNIVERSO DE TRABAJO:

Este estudio se realizó tomando los datos de los archivos de patología de la APEC, con diagnóstico histopatológico de MAP y/o melanoma conjuntival. Las laminillas de los casos fueron reevaluadas. Del tejido residual (bloques de parafina) de estos mismos casos, se seleccionaron aquellos que contenían suficiente material representativo, para la realización del estudio de inmunohistoquímica de la expresión de los genes p53, bcl-2 y PCNA con anticuerpos monoclonales.

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

No se realizó cálculo estadístico del tamaño de la muestra por no existir antecedentes de estudios previos de esta patología, se analizaron todos los casos con material representativo suficiente de 1994 a 2004.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

CRITERIOS DE INCLUSION:

- Pacientes con diagnóstico histopatológico de MAP y melanoma conjuntival.
- Ambos Sexos.
- Cualquier edad.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Expedientes incompletos.
- Pacientes con diagnóstico clínico de MAP y melanoma conjuntival de cualquier edad y género sin confirmación histopatológica.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Laminillas y/o bloques de parafina con muestra no representativa

VARIABLES A MEDIR.

1. VALORACION CLINICA.

Se realizó mediante una revisión de los archivos de patología cuyos datos se recolectaron en un formato elaborado por el investigador y tomando las siguientes variables:

- 1) Diagnóstico clínico
- 2) Diagnóstico histopatológico
- 3) Expediente
- 4) Nombre completo
- 5) Edad
- 6) Género
- 7) Ojo afectado

2. VALORACION INMUNOHISTOQUIMICA

Del tejido incluido en parafina se realizaron cortes de 4 μm de espesor que se mantuvieron a 10°C hasta ser analizados. Las secciones de tejido fueron desparafinadas en xilol y alcohol, y posteriormente lavadas en amortiguador salino de fosfatos (PBS). Se realizó recuperación de antígenos en olla de presión con microondas con amortiguador de citratos para la inmunotinción de p53 y con EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) para el estudio de las inmunotinciones de bcl-2 y PCNA. Las inmunotinciones fueron realizadas mediante el sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, utilizándose como tinción de contraste azul de metileno.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados y sus diluciones fueron: Anticuerpos contra bcl-2 (dilución 1:100), p53 (dilución 1:100) y PCNA (dilución 1:100) de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA) Los controles positivos incluidos fueron casos de nevos conjuntivales y como controles negativos se utilizaron los casos que no tiñeron con el anticuerpo primario para descartar una tinción inespecífica. Se utilizó únicamente el anticuerpo secundario como control negativo adicional en todos los casos.

Cuantificación

La interpretación de los patrones de inmunotinción se resume en la tabla I. De forma breve para bcl-2 se consideró como positiva aquellos casos con tinción citoplasmática, para p53 con tinción nuclear o citoplasmática y para PCNA aquellos casos con tinción nuclear.

En los casos de inmunorreactividad citoplasmática difusa se valoró de manera subjetiva la tinción como ausente (0) o presente (1).

En los casos de tinción nuclear se identificaron las áreas con mayor intensidad de tinción "hot spots", con los objetivos de x4 y x10 para cada tumor, se valoró el número de células positivas, en 10 campos de gran aumento, los cuales fueron promediados en 10 campos para dar el grado de proliferación celular en cada caso.

La cuantificación de células neoplásicas inmunorreactivas se efectuó por medios manuales y no se utilizó un sistema automático de análisis de imagen debido a la interferencia que ocasiona la melanina con los núcleos inmunoteñidos con peroxidasa. (Tabla I)

Todos los casos fueron evaluados mediante microscopia de luz (microscopio olympus Ch2 de doble cabezal). El análisis de las diferentes inmunotinciones fue realizado por un patólogo experimentado.

Análisis estadístico

El manejo estadístico se realizó con estadísticas no paramétricas. Las variables cuantitativas se resumieron en términos de mediana y rangos. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba U-Mann-Whitney. Las variables categóricas se resumieron en términos de frecuencias y porcentajes. Para la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se considerará como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. El programa SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago III) para Windows fue utilizado para el análisis estadístico.

RIESGOS Y BENEFICIOS.

El beneficio esperado fue estrictamente de carácter científico. Se pretende aportar un avance al conocimiento del papel de los genes mencionados en los procesos moleculares que intervienen en el proceso de carcinogénesis del melanoma conjuntival, en particular respecto a la transformación de lesión benigna a maligna. No existen riesgos a los que se someterán los pacientes dado que será un estudio retrospectivo en el archivo histopatológico de la APEC.

ASPECTOS ETICOS.

No se requerirá un consentimiento informado apegado a los requisitos de la secretaría de Salud para Investigación en Humanos y a la declaración de Helsinki puesto que la identidad de los pacientes no será revelada en el estudio.

COSTOS

Ninguno de las valoraciones realizadas por los investigadores tendrá algún costo para el paciente.

RESULTADOS

Datos demográficos

Se analizaron 4 casos de MAP con atíпия y 5 casos de melanoma conjuntival. Los pacientes con melanoma conjuntival eran mayores de edad en comparación con los casos de MAP (X=71 vs 59 años respectivamente). En todos los casos existió un predominio del género femenino, correspondiendo al 75% de los pacientes con MAP y al 60% de los pacientes con melanomas. No se observó diferencia en cuanto al ojo afectado en los casos de MAP y existió una mayor afección del ojo derecho en el 60% de los casos de melanoma. (Tabla II y III)

Inmunohistoquímica (Tabla IV)

Tanto en los casos de MAP como en los de melanoma se encontró una inmunotinción positiva para el marcador PCNA, el cual es un fiel índice de proliferación celular en cualquier tejido; La tinción fué mayor en los melanomas conjuntivales en comparación con las MAP (mediana: 17 , rangos de 3-50 vs 4.5 rangos de 0-9) (Figura 1) De forma interesante demostramos una alteración en la expresión de p53 en el 60% de los casos de melanoma conjuntival analizados, siendo el patrón de tinción citoplasmático el más frecuente. (Figura 2A y 2C); a diferencia de esta malignidad ninguno de los casos benignos de MAP expresó esta proteína (Figura 2B), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por último se debe señalar que a diferencia de otro tipo de melanomas, no se encontró un sobre-expresión citoplasmática de bcl-2 en ninguno de los casos de MAP o melanomas. (Figura 3A y 3B y Tabla IV).

DISCUSION.

La edad promedio de presentación de melanomas en diversas series varía de 52 a 60 años y los casos de MAP pueden presentarse 10 años antes (2,15). En nuestros resultados encontramos una edad mediana de presentación mayor a la reportada siendo de 59 años con intervalos entre los 25 y 84 años en el caso de MAP y una mediana de presentación de 71 años con intervalos entre los 46 y 81 años en el caso de los melanomas. Estas diferencias en edad pueden deberse a las condiciones socioeconómicas de nuestros pacientes ya que la mayoría proviene del medio rural, con un menor acceso a un tercer nivel de salud y un estrato socioeconómico y educativo menor (15). Con respecto al género encontramos una similitud en el predominio del sexo femenino en nuestra población estudiada, lo que concuerda con lo informado en la literatura mundial (2). Con respecto al ojo afectado no encontramos predominio por algún ojo en particular en casos de MAP y en el melanoma ligeramente más afectado el ojo derecho, lo que creemos no tiene significancia clínica, como ya se ha comentado en otra serie de casos (2).

El índice de proliferación celular utilizando PCNA, se ha descrito como un factor pronóstico independiente de sobrevida (16) ya que su expresión se encuentra incrementada en lesiones de mayor grado de malignidad tanto en el melanoma cutáneo como en el uveal (17, 18, 19). Nosotros encontramos una mayor expresión de PCNA en los casos de melanoma en comparación con los de MAP, lo que demuestra una relación directamente proporcional entre la proliferación celular medida por PCNA y el grado de malignidad de lesión conjuntival. Hasta este momento este es el primer informe que establece esta relación en la secuencia MAP-melanoma conjuntival ya que en el único informe previo de

expresión de PCNA solo se determinó en melanomas conjuntivales, donde se encontró puede funcionar como un factor pronóstico para determinar una menor supervivencia (20).

El hecho de encontrar la expresión citoplasmática intensa de p53 en el 60% de los casos de melanoma conjuntival y en ninguno de los casos de MAP, implica la participación de esta proteína en el proceso de oncogénesis de estos melanomas, situándose esta como un evento tardío, ya que el tejido pre-maligno (MAPs) todavía no demuestra una alteración en su expresión. Esto contrasta con lo publicado previamente por otros autores en los que han encontrado una mínima expresión focal de p53 en el 33% de los melanomas conjuntivales (21). Estas diferencias con nuestro estudio probablemente se deban a diferencias genéticas y/o ambientales de la población estudiada o a las características del anticuerpo utilizado. Nuestros resultados son similares a lo ocurrido en los casos de melanomas uveales en donde la mutación del p53 alcanza hasta un 66% de los casos (10, 22, 23, 24, 25). En lo que se refiere a la expresión de p53 en melanomas cutáneos su mutación ha sido más consistente hasta el 90% de los tumores por lo que parece desempeñar un papel importante en la biología de los melanomas de piel (13, 26, 27, 28, 29, 30, 31). Nuestros resultados demuestran que la proteína p53 desempeña un importante papel en la oncogénesis de los melanomas malignos de la conjuntiva mediante la pérdida de la función supresora de tumor o de la función inductora de la apoptosis, siendo esto un evento tardío debido a que sólo se encontró la mutación en los casos de melanoma. Estos

resultados incluyen al melanoma de la conjuntiva como uno más en la lista de tumores en los que se muta el p53 durante el proceso de oncogénesis.

Por último este es el primer estudio que analiza la expresión de bcl-2 en melanomas conjuntivales, en los que no encontramos inmureactividad para esta proteína. La expresión del bcl-2 ha mostrado resultados variados en los diferentes tipos de melanoma. En melanomas uveales se ha encontrado positividad hasta en el 96% de los tumores (10, 14). Por otra parte en los melanomas cutáneos la positividad parece ser menor al 50% (8, 32, 33, 34, 35, 36, 37). En los melanomas uveales se sugiere que el bcl-2 puede desempeñar un importante papel en el desarrollo del melanoma maligno por evitar que las células mueran por apoptosis (pudiendo quedar expuestas de esta forma a otros eventos secundarios) o a través de cooperación con otros oncogenes. Sin embargo algunos autores han encontrado que la expresión de bcl-2, aunque se detecte mediante inmunohistoquímica no tiene significado clínico de mal pronóstico en melanomas cutáneos y uveales (14, 38) o se relacione con el tamaño del tumor en melanomas cutáneos (13). En base a nuestros resultados parece ser que el bcl-2 no contribuye en la génesis del melanoma conjuntival y existen otras vías implicadas en la oncogénesis de este tumor como p53.

Nuestros resultados sugieren que existe una heterogeneidad genética entre los melanomas cutáneos, uveales y conjuntivales a pesar de su origen embrionario común, probablemente debido a variaciones ambientales y regionales, lo que

puede explicar las diferencias en el comportamiento biológico de los diferentes tipos de melanomas dependiendo de su localización anatómica (39).

CONCLUSION.

La alteración de la vía de p53 participa de forma importante en el desarrollo de la secuencia MAP-Melanoma conjuntival, facilitando el fenómeno de proliferación de las células malignas. Consideramos que los resultados presentados en este trabajo contribuirán en parte a la comprensión de la patogénesis de los melanomas conjuntivales.

REFERENCIAS.

1. Shields CL. Conjunctival melanoma: risk factors for recurrence, exenteration, metastasis, and death in 150 consecutive patients. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2000;98:471-92.
2. Seregard S. Conjunctival melanoma. *Surv Ophthalmol.* 1998 Jan-Feb;42(4):321-50.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
4. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993 Apr;9(4):138-41.
5. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene.* 1991 Sep;6(9):1699-703.
6. Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16
7. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1595-602
8. Mitselou A, Ioachim E, Kitsou E, Vougiouklakis T, Zagorianakou N, Makrydimas G, Stefanaki S, Agnantis NJ. Immunohistochemical study of apoptosis-related Bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki67, PCNA), tumor

- suppressor genes (p53, pRb), the oncogene c-erbB-2, sex steroid hormone receptors and other clinicopathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In Vivo*. 2003 Sep-Oct;17(5):469-77.
9. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15: 105-118.
 10. Brantley MA Jr, Harbour JW. Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol* 2000;157:1795–1801.
 11. Kelman Z. PCNA structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997; 14; 629–640.
 12. Ben-Izhak O, Bar-Chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J, Cagnano M, Cohen H, Sabo E. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology*. 2002 Dec;41(6):519-25
 13. Loggini B, Rinaldi I, Pingitore R, Cristofani R, Castagna M, Barachini P. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanomas: p53, PCNA, Bcl-2 expression and multidrug resistance. *Tumori*. 2001 May-Jun;87(3):179-86.
 14. Mooy CM, Luyten GPM, De Jong PTVM, Luider TM, Stijnen T, Van de Ham F et al. Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 1.097-1.104.
 15. Rodriguez-Reyes AA, Rios y Valles-Valles D, Corredor-Casas S, Gomez-Leal A. Advanced conjunctival melanoma. *Can J Ophthalmol*. 2004 Jun;39(4):453-60.
 16. Niezabitowski A, Czajewski K, Rys J, Kruczak A, Gruchala A, Wasilewska A, Lackowska B, Sokolowski A, Szklarski W. Prognostic evaluation of cutaneous

- malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol.* 1999 Mar;70(3):150-60.
17. Iyengar B. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): proliferative phase functions and malignant transformation of melanocytes. *Melanoma Res.* 1994 Oct;4(5):293-5.
 18. Bjornhagen V, Bonfoco E, Brahme EM, Lindholm J, Auer G. Morphometric, DNA, and proliferating cell nuclear antigen measurements in benign melanocytic lesions and cutaneous malignant melanoma. *Am J Dermatopathol.* 1994 Dec;16(6):615-23.
 19. Vecchiato A, Rossi CR, Montesco MC, Frizzera E, Seno A, Piccoli A, Martello T, Ninfo V, Lise M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and recurrence in patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 1994 Aug;4(4):207-11
 20. Seregard S. Cell proliferation as a prognostic indicator in conjunctival malignant melanoma. *Am J Ophthalmol.* 1993 Jul 15;116(1):93-7.
 21. Seregard S. Cell growth and p53 expression in primary acquired melanosis and conjunctival melanoma. *J Clin Pathol.* 1996 Apr;49(4):338-42.
 22. Tobal K, Warren W, Cooper CS, McCartney A, Hungerford J, Lightman S. Increased expression and mutation of p53 in choroidal melanoma. *Br J Cancer* 1992; 66: 900-904.
 23. Korabiowska M, Brinck U, Hoenig JF et al. Significance of p53 antigen in malignant melanomas and naevi of the head and neck area. *Anticancer Res* 1995; 15: 855-859

24. Jay M, McCartney ACE. Familial malignant melanoma of the uvea and p53; A Victorian detective story. *Surv Ophthalmol* 1993; 37: 457-462.
25. Janssen K, Kuntze J, Busse H, Schmid KW. p53 oncoprotein overexpression in choroidal melanoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 267-272.
26. Stretch JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 4.976-5.979.
27. Volkenandt M, Schlegel U, Nanus DM, Albino AP. Mutational analysis of the human p53 gene in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 1991; 4: 35-40.
28. Sparrow LE, Soong R, Dawkins HJ, Iacopeta BJ, Heenan PJ. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995; 5: 93-100.
29. Weis J, Heine M, Arden KC. Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res* 1995; 139: 137-154.
30. Rhim KJ, Hong SI, Hong WS, Lee SY, Lee DS, Jang JJ. Aberrant expression of p53 gene product in malignant melanoma. *J Korean Med Sci* 1994; 9: 376-381.
31. Barnhill RL, Castresana JS, Rubio MP et al. p53 expression in cutaneous malignant melanoma: an immunohistochemical study of 87 cases of primary, recurrent, and metastatic melanoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 533-535.
32. Van Den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 Expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am J Pathol* 1994; 145: 294-300.

33. Plettenberg A, Ballum C, Pammer J, Mildner M, Strunk D, Weninger W et al. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 protooncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol* 1995; 146: 651-659.
34. Morales-Ducret CR, Van de Rijn M, Lebrun DP, Smoller Br. bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 1995; 131: 909-912.
35. Cerroni L, Soyer HP, Kerl H. bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1995; 17: 7-11.
36. Ramsay JA, From L, Kahn HJ. bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Mod Pathol* 1995; 8: 150-154.
37. Radhi JM: Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components. *J Cutan Med Surg* 1999, 3:293–297
38. Sulkowska M, Famulski W, Bakunowicz-Lazarczyk A, Chyczewski L, Sulkowski S. Bcl-2 expression in primary uveal melanoma. *Tumori*. 2001 Jan-Feb;87(1):54-7.
39. J S Chana, G D Wilson, I A Cree, R A Alexander, N Myatt, M Neale, A J E Foss, J L Hungerford c-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma *Br J Ophthalmol* 1999;83:110–114.

TABLAS

TABLA I

REACCIONES DE INMUNOHISTOQUIMICA EN MELANOMA CONJUNTIVAL

MARCADOR	INMUNOTINCION CELULAS NORMALES	INMUNOTINCION CELULAS MUTADAS	CONSECUENCIA DE MUTACION
PCNA	Tinción nuclear Presente (núcleos)	Tinción nuclear Presente/Incrementa (núcleos)	Incremento Proliferación
p53	Ausente	Núcleos citoplasmáticos	Disminución Apoptosis
bcl-2	Ausente	Tinción citoplasmática	Evasión Apoptosis

TABLA II

DATOS DEMOGRAFICOS

VARIABLE	MAP	MELANOMA
N	4	5
EDAD (años)	59 (25-84)	71 (46-81)
SEXO	M - 25% F -75%	M - 40% F -60%
OJO	D - 50% I - 50%	D - 60% I - 40%

MAP, Melanosis adquirida primaria; F, Femenino; M, Masculino; D, Derecho; I, Izquierdo

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

TABLA III

CARACTERISTICAS CLINICAS E INMUNOHISQUIMICAS DE LOS CASOS

CARACTERISTICAS CLINICAS					INMUNOHISTOQUIMICA	
CASO	DIAGNOSTICO	EDAD	SEXO	OJO	PCNA*	p53+
1	MAP	71	F	D	1	0
2	MAP	29	F	I	1	0
3	MAP	65	F	I	8	0
4	MAP	54	M	D	9	0
5	MELANOMA	71	F	D	50	1
6	MELANOMA	51	F	I	32	1
7	MELANOMA	75	F	I	16	1
8	MELANOMA	47	M	D	3	0
9	MELANOMA	77	M	D	17	0

MAP, Melanosis adquirida primaria; F, Femenino; M, Masculino; D, Derecho; I, Izquierdo; PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular); *Promedio de Células teñidas en 10 campos 40x; p53, tinción presente o ausente.

TABLA IV

RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICA

MARCADOR	MAP	MELANOMA	CONSECUENCIA
PCNA	4.5(0-9)*	17(3-50)*	Incremento Proliferación
p53	0%	60%+	Mutación
bcl-2	NEG	NEG	No mutado

PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular); *Mediana (Rangos) del Promedio de Células teñidas en 10 campos 40x; p53, porcentaje de los tumores teñidos+.

FIGURA 1

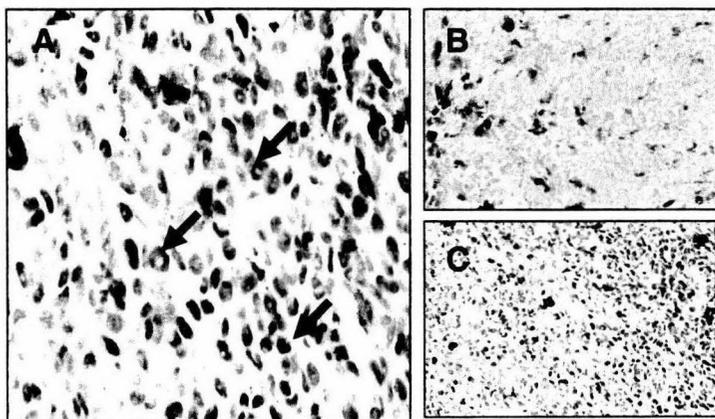


Figura 2

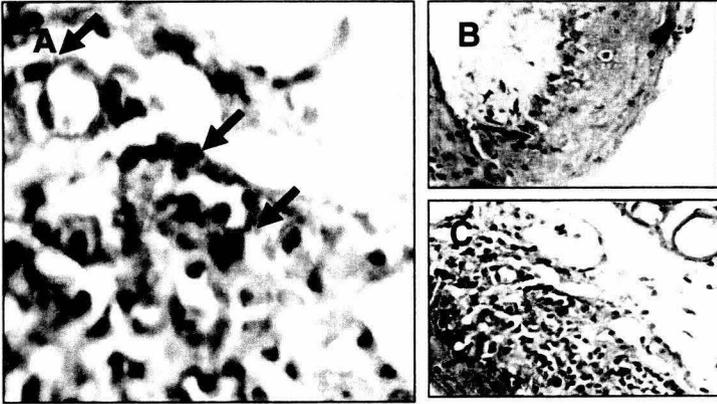
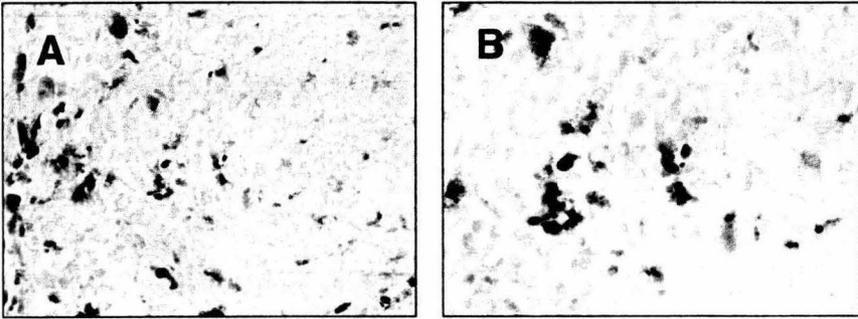


Figura 3



PIE DE FIGURAS

FIGURA 1. A. Tinción nuclear intensa (flechas) en un caso de melanoma conjuntival. **B,** Tinción nuclear leve en un caso pre-maligno de MAP. **C,** Tinción nuclear intensa un caso de melanoma. (PCNA, sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, aumento original x40 (A) y x20 (B,C))

FIGURA 2.. A, Tinción citoplasmática intensa (flechas) en un caso de melanoma maligno; **B,** Ausencia de p53 en un caso pre-maligno de MAP, que contrasta con la positividad en un estadio maligno **C.** (p53, sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, aumento original x40 (A) y x20 (B,C))

FIGURA 3. A. Se observa ausencia de tinción citoplasmática tanto en un caso de MAP como de melanoma conjuntival (**B**). (bcl-2, sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, aumento original x20 (A,B))