



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN
Y
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO, I.A.P.

PREVALENCIA DE P53, VPH 16 Y 18 EN NEOPLASIAS
ESCAMOSAS DE LA SUPERFICIE OCULAR Y SU CORRELACION
CON LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA TOPICA CON
INTERFERON ALFA 2B

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
DRA. NALLELY RAMOS BETANCOURT

TUTOR-DIRECTOR DE TESIS
DR. EN C. JORGE JANS FROMOW GUERRA
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO, I.A.P.

CO-TUTOR
DR. EN C. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ ZIMBRÓN
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO, I.A.P.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. MAYO 2022



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.

Dedicatoria

A mi hijo Enrique, pequeña y brillante estrella que ilumina mi corazón y guía mi camino.

A mis padres y hermana por su amor y apoyo incondicional.

Colaboradores

Dr. Luis Fernando Hernández Zimbrón, Departamento de Investigación, APEC

Dr. Jesús Dávila Alquisiras, Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva, APEC

Dr. Roberto García Vázquez, Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva, APEC

Dr. Kristian Alfonso Vázquez Romo, Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva, APEC

Dra. Judith L. Acosta Piña, Servicio de Patología Ocular, APEC

Dra. Dolores Ríos Valles y Valles, Servicio de Patología Ocular, APEC

Dra. Yvette Hernández Ayuso, Servicio de Patología Ocular, APEC

Dr. Luis Antonio Delgado Soler, Servicio de Patología, Médica Sur

Dr. Abelardo Rodríguez Reyes, Servicio de Patología Ocular, APEC

Dr. Everardo Hernández Quintela, Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva, APEC

Matthew G. Field, Departamento Oftalmología, Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami

Carol L. Karp, MD. Departamento Oftalmología, Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami

Anat Galor, MD. MSc. Departamento Oftalmología, Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami

Gaofeng Wang, PhD. Departamento Oftalmología, Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami

Comité tutor

Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra, Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”

Dr. Julio Granados Arriola, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo otorgado durante mis estudios como becario CONACyT.

El análisis mutacional por secuenciación de exones forma parte de un proyecto paralelo a esta investigación, el cual fue realizado gracias a un generoso grant de Pfizer a la ARVO Foundation for Eye Research, premio obtenido con colaboración de Bascom Palmer: 2016 ARVO Foundation/Collaborative Research Fellowship por 10,000USD.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| MARCO TEÓRICO | 7 |
| DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS ESCAMOSAS DE SUPERFICIE OCULAR. | 7 |
| EPIDEMIOLOGÍA | 10 |
| FISIOPATOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO | 14 |
| DIAGNÓSTICO | 17 |
| TRATAMIENTO | 24 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 26 |
| OBJETIVOS | 26 |
| OBJETIVO PRIMARIO | 26 |
| OBJETIVOS SECUNDARIOS..... | 26 |
| HIPÓTESIS | 27 |
| HIPÓTESIS PRIMARIA..... | 27 |
| HIPÓTESIS SECUNDARIAS | 27 |
| MÉTODOS | 27 |
| DISEÑO DEL ESTUDIO..... | 27 |
| CRITERIOS DE SELECCIÓN | 28 |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA | 28 |
| DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS MÉTODOS..... | 29 |
| DEFINICIONES OPERATIVAS | 32 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 33 |
| ASPECTOS ÉTICOS | 33 |
| RESULTADOS | 35 |
| CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN | 35 |
| HALLAZGOS POR IMAGEN E HISTOPATOLÓGICOS DE LAS NESO..... | 37 |
| INMUNODETECCIÓN DE P53..... | 37 |
| ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN COMPLETA DE EXONES | 39 |
| DISCUSIÓN | 41 |
| CONCLUSIONES | 44 |
| REFERENCIAS | 45 |
| ABREVIATURAS (EN ORDEN ALFABÉTICO) | 51 |

Marco teórico

Definición y clasificación de las neoplasias escamosas de superficie ocular

La superficie ocular (SO) incluye diversas estructuras: la córnea, el limbo, la conjuntiva y las glándulas de Meibomio. El epitelio corneal y conjuntival se encuentran en continuidad a través de los epitelios ductales con el epitelio acinar de las glándulas lagrimales principales y accesorias, así como con las glándulas de Meibomio de los párpados, que son invaginaciones especializadas de la superficie ocular. Todas estas estructuras comparten el mismo origen embriológico (ectodermo).¹

Las neoplasias escamosas de la superficie ocular (NESO) constituyen el tumor maligno más frecuente de la superficie ocular y abarcan un amplio espectro de tumores que afectan la SO. Histológicamente, las NESO van desde lesiones displásicas de las células escamosas, hasta el carcinoma invasor de conjuntiva y córnea.²⁻⁴

El grado de involucro anatómico de la lesión es importante para determinar el manejo y poder explicar el pronóstico al paciente. Se describe a continuación la clasificación de tumores epiteliales de acuerdo con su grado de malignidad en la **Tabla 1**:⁵

| Grado de malignidad | Lesión |
|---------------------|----------------------------------|
| Benignos | Papiloma escamoso |
| | Hiperplasia benigna del epitelio |
| | Queratoacantoma |

| | |
|--------------------|--|
| Premalignos | Acantosis |
| | Queratosis actínica |
| | Metaplasia escamosa |
| | Neoplasia intraepitelial conjuntival (NIC) |
| Malignos | Carcinoma epidermoide |

Tabla 1. Clasificación de tumores epiteliales por su grado de malignidad.

Fuente: Adaptado de Shields CL, et al. (2017)⁵

Las NIC se dividen en 3 grados, de acuerdo al involucro del espesor epitelial:^{6,7}

- Grado I o displasia leve: confinado al tercio basal del epitelio.
- Grado II o displasia moderada: se extiende al tercio medio del epitelio.
- Grado III o displasia severa: Se extiende al tercio superficial del epitelio.

Se considera como “carcinoma *in situ*” cuando se invade el espesor completo del epitelio, sin sobrepasar la membrana basal epitelial. Es importante mencionar, que el manual de clasificación American Joint Committee on Cancer (AJCC)⁸ coloca al carcinoma *in situ* dentro de las NIC (correspondería al grado III). Una vez que sobrepasa la membrana basal del epitelio, se denominará carcinoma epidermoide (CE) o de células escamosas. El término “invasor” indica infiltración del estroma subyacente sobrepasando la membrana basal.

Para el presente trabajo, el término NESO incluirá las NIC y el carcinoma epidermoide.

Existe otra clasificación de las NESO, de la AJCC, en la que el cáncer se estadia por tipo de tumor, la presencia de infiltración nodular y de metástasis (TNM), como se muestra en la **Tabla 2**.

Definición de tumor primario (T)

TX El tumor primario no puede identificarse

T0 Sin evidencia de tumor primario

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor (≤ 5 mm en su diámetro mayor) que invade la membrana basal conjuntival sin invasión de estructuras adyacentes.

T2 Tumor (> 5 mm en su diámetro mayor) que invade la membrana basal conjuntival sin invasión de estructuras adyacentes.

T3 Tumor que invade estructuras adyacentes*, excluyendo la órbita.

T4 Tumor que invade la órbita con o sin mayor extensión.

T4a Invade tejidos blandos orbitarios, sin invasión a hueso.

T4b Invade hueso

T4c Invade senos paranasales adyacentes

T4d Invade tejido cerebral

Definición de ganglios linfáticos regionales (N)

NX Los ganglios linfáticos regionales no son evaluados

| | |
|---|--|
| N0 | Ganglios linfáticos regionales ausentes |
| N1 | Ganglios linfáticos regionales presentes |
| Definición de metástasis a distancia (M) | |
| M0 | Metástasis a distancia ausente |
| M1 | Metástasis a distancia presente |
| Definición de grado histopatológico (G) | |
| GX | El grado no puede determinarse |
| G1 | Bien diferenciado |
| G2 | Moderadamente diferenciado |
| G3 | Pobrementemente diferenciado |
| G4 | Indiferenciado |

Tabla 2. Clasificación de la AJCC del carcinoma conjuntival. Traducido de Shields CL et al. (2017).⁵ *Estructuras adyacentes: córnea, fondos de saco, conjuntiva tarsal, punto o canalículo lagrimal, carúncula, lamela anterior o posterior del párpado, margen palpebral, invasión intraocular.

Epidemiología

Las NESO son una patología infrecuente. La literatura que aporta datos epidemiológicos sobre estos tumores es escasa. Además, cabe mencionar que la metodología para la obtención de los datos así como la presentación de resultados es sumamente heterogénea;

pocos reportan información a nivel nacional, algunos son estudios multicéntricos y otros son datos de centros únicos. También varía el tipo de centro hospitalario, proviniendo ya sea de hospitales generales o centros de referencia oftalmológica. Por otro lado, los tipos de población son diferentes en términos de localización geográfica y raza. Finalmente, algunos reportan exclusivamente el carcinoma epidermoide y, otros, el espectro completo de las NESO.

Quizá la publicación más importante respecto a epidemiología de las NESO es la de Gichuhi et al⁷, una revisión sistemática realizada en 2013 con el objetivo de describir la epidemiología de la enfermedad en África y, secundariamente, a nivel global. Los resultados se reportaron mediante la tasa de incidencia estandarizada por edad (TIEE) para ambos sexos. Los autores encontraron que la TIEE media a nivel mundial fue de 0.18 y 0.08 casos/año/100,000 para hombres y mujeres, respectivamente; siendo la menor TIEE reportada en Europa con 0.05 y 0.01 casos/año/100,000 y la mayor en Zimbawe, África con 3.4 y 3.0 casos/año/100,000. El continente africano tuvo la mayor incidencia de la enfermedad, seguido de Sudamérica y Oceanía.

La mayor parte de los reportes sugieren que la enfermedad se presenta clásicamente en pacientes del sexo masculino, mayores de 60 años.^{4,5} Sin embargo, dependiendo de la localización geográfica y el estado inmunológico, puede presentarse en poblaciones más jóvenes y sin predominio de sexo, sobre todo cuando existe asociación con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁷ Esta forma de presentación se reportó en poblaciones africanas, donde el espectro de la enfermedad es muy distinto. Los mismos autores han subrayado la importancia de la geografía de la población, que fue dividida de acuerdo a su localización respecto al ecuador, siendo los países en el hemisferio sur los que suelen

presentar una mayor incidencia. Se han propuesto dos patrones demográficos de acuerdo con la edad de presentación, el sexo y la asociación a infecciones virales, como se muestra en la **Tabla 3**.

| Características | Climas templados | Climas tropicales |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Predominio por género | Sí, masculino | No |
| Edad de presentación | Adultos mayores | Jóvenes |
| Asociación a VPH | Rara | Frecuente |
| Asociación a VIH | Rara | Frecuente |
| Países ejemplo | Estados Unidos | Zimbawe |
| | Australia | Uganda |

Tabla 3. Patrones demográficos de las NESO. VPH: Virus del papiloma humano; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana. Fuente: Adaptado de Gichuhi et al (2013).⁷

Contamos con algunos reportes de nuestro país, todos provenientes de centros hospitalarios aislados, la mayoría de referencia oftalmológica. En México no contamos con un registro nacional de datos sobre este tipo de tumores, probablemente debido a que su incidencia y mortalidad es muy baja en comparación con el cáncer de mama, próstata, colon, pulmón, cervicouterino y tiroides, en los cuales se centran la mayor parte de los esfuerzos de los servicios de salud a nivel nacional de acuerdo a los datos de la Organización panamericana de la salud.⁹

En los reportes mexicanos, todos de la Ciudad de México, la mayor parte de los casos tenía una edad al diagnóstico alrededor de los 60 años y, en promedio, no hubo una diferencia

por sexo. Sin embargo, los estudios fueron muy heterogéneos en la población estudiada; es el caso de Capiz-Correa y colaboradores¹⁰, que se centraron en el carcinoma epidermoide a diferencia de los otros dos en los que se reportaron también las lesiones benignas, displasias y/o el carcinoma in situ¹¹. Las características principales de dichos estudios se muestran en la **Tabla 4**.

| Referencia (año) | Orrostieta-Olvera (2008) ¹¹ | Capiz-Correa (2016) ¹⁰ | Ramos-Betancourt (2016) ¹² |
|-----------------------------|---|---|---|
| Estado | Ciudad de México | Ciudad de México | Ciudad de México |
| Hospital | Hospital General de México | Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz | Asociación para evitar la ceguera en México |
| Tipo de centro hospitalario | General y de referencia oftalmológica | De referencia oftalmológica | De referencia oftalmológica |
| N | 32 | 129 | 241 |
| Periodo de estudio | 11 años (1996-2007) | 7 años (2006-2013) | 10 años (2005-2015) |
| Edad en años, media | 60.7 | 64.7 | 58.6 |

| | | | |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Sexo masculino, % (n) | 46.87% (15) | 67.44% (87) | 56.4% (136) |
| Grado Histopatológico, % (n) | - | - | 42.7% (103) |
| Papiloma | 6.25% (2) | - | 21.2% (51) |
| Displasia | | | 2.1% (5) |
| NIC I | | | 7.5% (18) |
| NIC II | | | 11.6% (28) |
| NIC II | 37.5% (12) | - | - |
| Carcinoma <i>in situ</i> | 56.25% (18) | 100% (129) | 19.9% (48) |
| Carcinoma epidermoide | | - | 16.2% (39) |
| Otros (ej. queratosis actínica) | | | |

Tabla 4. Resumen de los resultados reportados en las series mexicanas sobre NESO.

Fisiopatología y factores de riesgo

La etiología de las NESO es multifactorial, e incluye factores intrínsecos y extrínsecos.

Entre los principales factores de riesgo implicados en la patogénesis de las NESO se incluyen la radiación ultravioleta (UV), tabaquismo, inmunosupresión, susceptibilidad

genética, daño preexistente de la superficie ocular, exposición a químicos y deficiencia de vitamina A.¹³ Así mismo, el virus del papiloma humano (VPH) también ha sido implicado en la patogénesis de NESO, pero se considera más un cofactor en el desarrollo de la enfermedad en huéspedes previamente susceptibles que un factor etiológico.^{5,14}

Los mecanismos fisiopatogénicos involucrados en el desarrollo de NESO pueden ser por daño al ácido desoxirribonucleico (DNA), falla en los mecanismos de reparación del DNA y/o por una inmunidad reducida.²

La radiación ultravioleta B (UVB) puede ocasionar una “foto-inmunosupresión” local y sistémica, daño directo al DNA y un entrecruzamiento de las bases para formar dímeros de ciclobutano pirimidina^{2,15}, los cuales se consideran como característicos del daño por radiación UV.^{2,16} Estos dímeros alteran la estructura del DNA y bloquean su síntesis.² Así mismo, se ha reportado que existen transiciones específicas de ciertas bases del gen supresor de tumores TP53 en NESO, las cuales pueden ocurrir en diferentes fases de la transformación maligna y pueden encontrarse en lesiones precancerosas, tales como la queratosis actínica. Dichos mecanismos llevan a un retraso en la reparación del DNA y a un incremento en las mutaciones somáticas y oncogénesis.²

Por otro lado, la mayoría de las NESO se derivan del limbo, particularmente en el área nasal interpalpebral.¹⁷ Es en esta región en donde se ha descrito que existe una más alta concentración de criptas epiteliales limbares¹⁸ que contienen a las células madre del limbo. Así mismo, esta zona anatómica es la que se encuentra descubierta durante la apertura normal de los párpados, haciéndola más susceptible al daño por radiación UV. Por otra parte, se ha postulado que las neoplasias intraepiteliales conjuntivales (NIC) inician en las

células basales y se extienden hacia la superficie, patrón que se refleja en la clasificación histológica.¹⁹

Finalmente, la exposición a radiación UVB reactiva la infección latente por VPH,¹⁷ el cual es un virus de DNA epiteliotrófico, especialmente en la mucosa de transición, y ha sido implicado en la etiología de diversos carcinomas de células escamosas, tales como cérvix uterino, colorectal, laríngeo, esofágico, vesical y de la superficie ocular.²

Participación de genes en la progresión del tumor

La progresión del tumor resulta de la acumulación de múltiples mutaciones tanto en genes supresores de tumor como en oncogenes. Los genes supresores de tumores y sus proteínas juegan un papel importante en la prevención del crecimiento de tumores al regular negativamente el crecimiento celular en donde el gen p53 es el prototipo de gen supresor de tumor. Este gen consiste en 11 exones y se localiza en el cromosoma 17p13 en humanos. Una mutación de p53 lleva a disminución en la expresión de la proteína Bcl-2, que es una proteína de membrana necesaria para la longevidad celular y facilitar un sistema inmune saludable.²⁰ Mutaciones en este gen alteran los mecanismos de reparación del DNA permitiendo la proliferación celular. Además, se ha observado que hasta en el 70% de los casos de NESO existe una reacción positiva a p53 alterada².

El Virus del Papiloma Humano (VPH) ha sido implicado en la etiología de diversos carcinomas de células escamosas (cervico-uterino, colorectal, laríngeo, esofágico, vesical). En las NESO se ha reportado una prevalencia entre 33 hasta 100% de los casos.

Por otra parte, ha observado un incremento en la expresión de p16 en lesiones escamosas asociadas a VPH, y su grado de expresión y tinción en la inmunohistoquímica correlaciona

con el grado de displasia, siendo intensa en las lesiones de alto grado, con un patrón difuso tanto nuclear como citoplásmico. La expresión aumentada de p16 es dada por la neutralización de proteínas supresoras de tumor p53 y la proteína de retinoblastoma (pRb) por los oncogenes E6 y E7 de las células infectadas con VPH. Los subtipos de VPH de bajo riesgo suelen mostrar menor expresión de p16 debido a que producen oncogenes E6 y E7 con menor habilidad para neutralizar a los supresores tumorales endógenos. Por tanto, la expresión de p16 es comúnmente empleada como un marcador de infección por los subtipos de VPH de alto riesgo.²¹

El interés en la oncoproteína p53 yace en su implicación para el desarrollo de tratamiento para NESO debido a su potencial capacidad pronóstica. Los tumores negativos a p53 no responden bien a quimioterapia dirigida a dañar el DNA.²⁰ Su presencia suele conferir un mayor grado de proliferación y estadio a diversos tumores, así como incrementar su mayor tasa de recurrencia;²⁰ por lo tanto, p16 nos permitirá conocer si existe relación de las neoplasias con VPH y Ki-67 con la tasa de proliferación del tumor.

Solo existe un estudio publicado que analiza mutaciones específicas en NESO por medio de una tecnología de secuenciación completa de exones, lo cual se realizó en una cohorte de 7 individuos en Miami. En ese estudio, las mutaciones más frecuentes en los genes que promueven la oncogénesis como el factor de crecimiento de hepatocitos (*HGF*).²²

Diagnóstico

Clínico

Las NESO suelen iniciar con síntomas inespecíficos como sensación de cuerpo extraño, irritación y enrojecimiento. Con el paso del tiempo, el paciente nota la lesión y es entonces

cuando acude a consulta. En una gran parte de los casos, las NESO se originan de degeneraciones conjuntivales preexistentes, tales como una pingüécula o un pterigión, pasando en ocasiones desapercibido por el médico. Las lesiones son típicamente unilaterales y de crecimiento lento, a menos que el paciente tenga alguna comorbilidad que lo predisponga a un crecimiento acelerado y, en ocasiones, a presentarse de manera bilateral (por ejemplo, la inmunosupresión asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida – SIDA).

El 95% de las lesiones se originan en el limbo, y su localización más frecuente es el área interpalpebral, que es el área expuesta a la radiación solar.²³

Clínicamente estas neoplasias pueden presentar un aspecto papilomatoso, así como cambios leucopláquicos, abarcando cualquier localización de la superficie ocular. Cuando invaden la córnea, se presentan lesiones grisáceas, con márgenes digitiformes e irregulares y pueden presentar diferentes grados de vascularización.^{2,4} Así mismo, pueden mostrar pigmentación, dato clínico considerado como factor de riesgo para sobrepasar la membrana basal, es decir, para carcinoma epidermoide. (Figura 1)

En cuanto a su distribución sobre la superficie ocular, se dividen en nodular, cuando la lesión está bien circunscrita (generalmente en uno o dos cuadrantes), o difusas, que se extienden por 6 o más meridianos o miden ≥ 15 mm en su diámetro mayor.^{23,24} A estas últimas también se les conoce como neoplasias gigantes. (Figura 2)



Figura 1. Neoplasia escamosa de la superficie ocular. Se observa una lesión sobre elevada, gelatinosa, con vaso nutricio (inferior), leucoplaquia (área blanquecina cercana al limbo) y pigmento. Fuente: Archivo fotográfico APEC.

Además de las típicas características clínicas, se pueden utilizar tinciones vitales para confirmar la sospecha diagnóstica de NESO. Las tinciones de verde de lisamina (Figura 3) y rosa de bengala se utilizan para teñir y delinear la extensión de la lesión; pero no son específicas para la enfermedad.²⁵ El azul de toluidina y el de metileno son tinciones acidófilas que tienen afinidad por ácidos nucleicos presentes en las lesiones malignas que son liberados debido a la alta tasa de mitosis y pobre adherencia intercelular. Aunque la sensibilidad de dichas tinciones es alta, su especificidad es baja a moderada, por lo cual se sugiere utilizarlos como una herramienta de tamizaje inicial²⁵⁻²⁷.

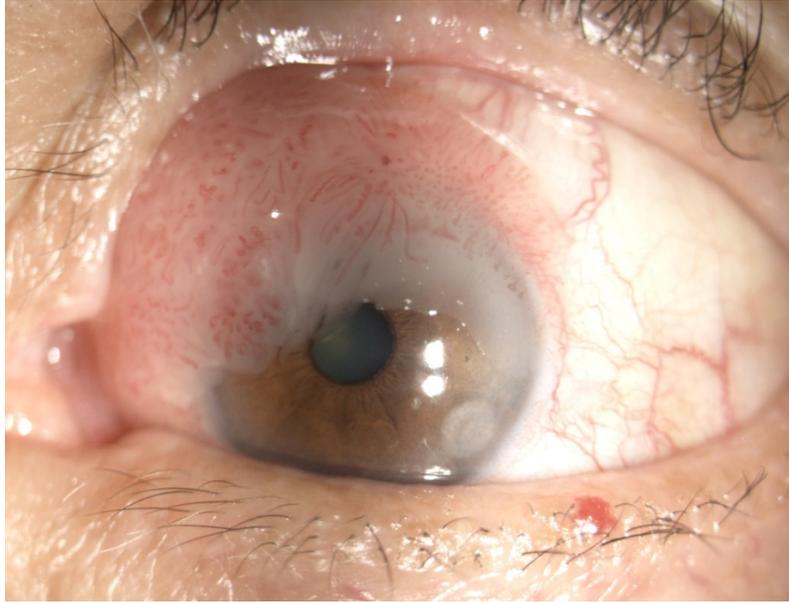


Figura 2. Neoplasia escamosa gigante de la superficie ocular. Se observa una lesión de aspecto papilomatoso con un borde gelatinoso y grisáceo sobre la córnea, invadiendo más de 6 meridianos del limbo. Fuente: Archivo fotográfico APEC.

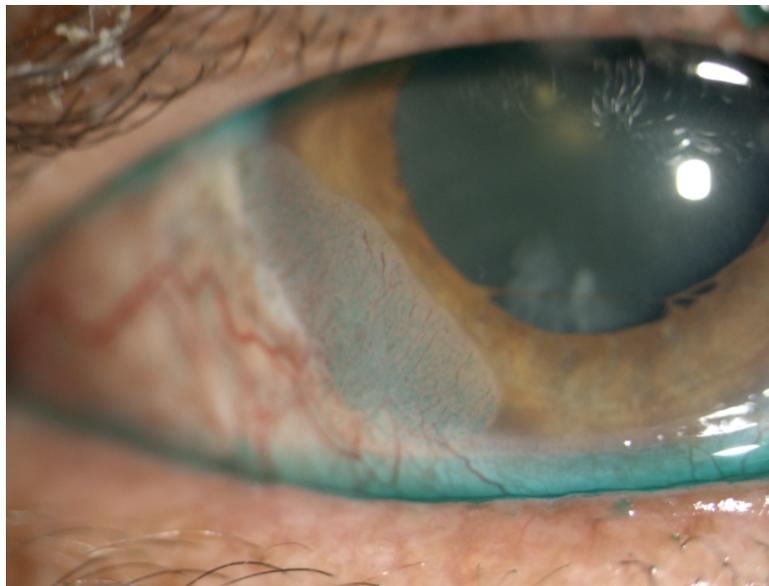


Figura 3. Tinción con verde de lisamina de una NESO. Fuente: Archivo fotográfico APEC.

Estudio histopatológico

El estándar de oro para el diagnóstico de NESO es el estudio histopatológico. La biopsia se puede dividir en tres tipos: excisional, incisional y por mapeo. Cada una tiene sus indicaciones y contraindicaciones dependiendo del tipo de lesión, la extensión de esta y las estructuras anatómicas afectadas. Generalmente utilizamos la biopsia excisional como tratamiento de primera línea para el manejo de NESO, indicada principalmente en lesiones bien circunscritas de tamaño pequeño o moderado y siempre acompañada de crioterapia en los bordes quirúrgicos así como la colocación de una membrana amniótica para cubrir el defecto conjuntival y/o corneal secundario a la resección del tumor. La incisional es mayormente utilizada, específicamente en lesiones escamosas, únicamente para confirmación diagnóstica antes de iniciar la quimioterapia tópica o para valorar cirugía mutilante en lesiones de gran tamaño con sospecha y/o evidencia de invasión intraocular o a tejidos adyacentes (ej. Órbita).

Cabe mencionar que existen otras herramientas para toma de tejido para diagnóstico histopatológico, como la citología por exfoliación y la citología de impresión, ambas con la debilidad de evaluar únicamente las capas superficiales del epitelio de conjuntiva o córnea.²⁵ Es decir, si la lesión es subepitelial o se localiza en capas más profundas, lo cual sucede en las etapas más tempranas de la enfermedad, estas muestras de tejido no serán de utilidad diagnóstica y nos llevará a falsos negativos. La clasificación histopatológica fue explicada previamente.

Estudios de imagen

Tomografía de coherencia óptica de alta resolución (HR-OCT)

La HR-OCT es una técnica no invasiva que nos permite evaluar morfológicamente la arquitectura corneal y limbal, así como diferentes características de las neoplasias con una resolución axial de 3-5 micras. Utilizando esta herramienta, las NESO muestran típicamente un epitelio engrosado (mayor a 120 micras) e hiper-refléctico, con una transición abrupta entre el tejido normal y el neoplásico. (Figura 4) La sensibilidad y especificidad de este método diagnóstico es de 94% y 100%, respectivamente.^{28,29}

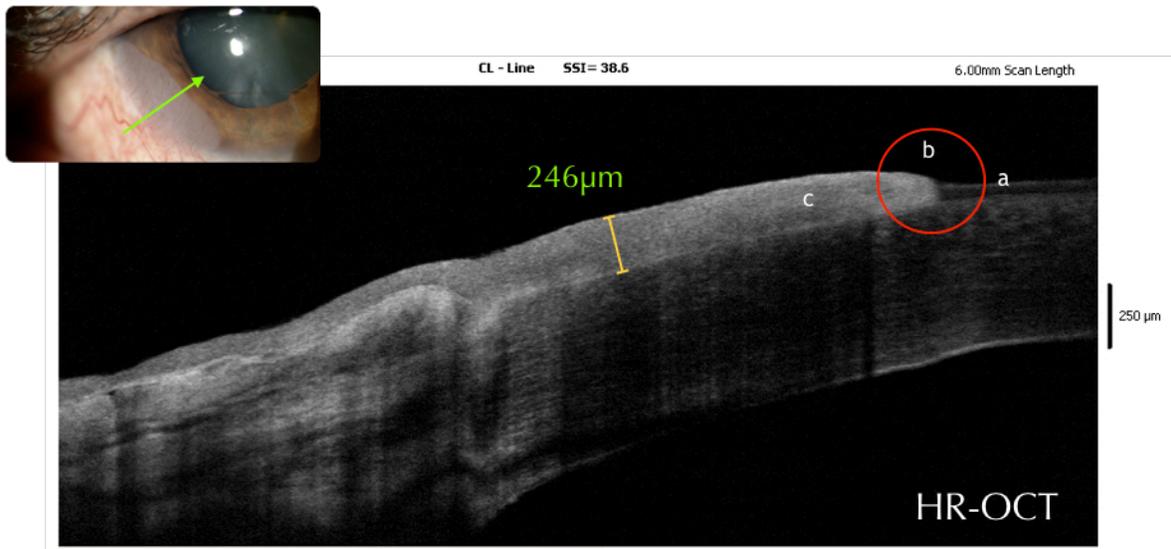


Figura 4. Tomografía de coherencia óptica de alta resolución en un paciente con NESO. Se observa hiper-reflectividad y engrosamiento del epitelio enfermo (mayor a 120 micras) (c) y la zona de transición abrupta (b) entre el epitelio sano (a) y el enfermo (c). Fuente: Archivo APEC, edición por el Dr. Jesús H. Dávila Alquisiras.

Ultrabiomicroscopía del segmento anterior (UBM) y microscopía confocal

La ultrabiomicroscopía del segmento anterior proporciona imágenes hasta de 5 a 6mm de profundidad con una resolución mucho menor a la del HR-OCT, de 25 micras, por lo que su utilidad se ha limitado como una herramienta para determinar la presencia de invasión a tejidos profundos como esclera o cuerpo ciliar²⁵. Las NESO se observan con una superficie hiperecoica y el estroma hipoecoico. Los signos sugestivos de extensión intraocular del tumor son acortamiento del ángulo de la cámara anterior y engrosamiento uveal.³⁰

La microscopía confocal también es una técnica no invasiva que permite examinar las capas de la superficie ocular con una alta resolución, permitiendo observar las estructuras a

nivel celular. En las NESO, las células tumorales se observan grandes, irregulares, con un núcleo brillante e hiperrefléctico y también se ha descrito la presencia de células alargadas con núcleo polimórfico.^{25,31}

Otras herramientas.

Se ha descrito que diversos virus y que algunas alteraciones en ciertos genes están relacionados con el desarrollo de las NESO. Para determinar su participación existen varias técnicas como inmunohistoquímica (IHQ), hibridación in situ (HiS) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre estas técnicas la IHQ es de las más empleadas por su fácil acceso y bajo costo.

TRATAMIENTO

En años recientes han surgido múltiples avances en el diagnóstico y tratamiento de NESO. El tratamiento de las NESO ha cambiado de quirúrgico a médico con interferón alfa 2b (IFN), 5-fluorouracilo (5-FU) o mitomicina C (MMC) debido a que estos fármacos han demostrado una eficacia comparable a la cirugía con escasos efectos adversos y una baja tasa de recurrencias. Aún con los avances en diagnóstico y tratamiento, persisten ciertos tumores refractarios a tratamiento tópico y las recurrencias pueden ocurrir hasta en 10 a 15% de los casos.³²

Tratamiento médico con quimioterapia tópica

Debido a la alta tasa de recurrencia de NESO, se ha incrementado el uso de quimioterapia tópica. Las ventajas del manejo médico son:

1. Tratamiento de toda la SO
2. Tratamiento de lesiones subclínicas/microscópicas
3. Evita deficiencia de células de limbo (DCL) posquirúrgica

La quimioterapia tópica solía indicarse en pacientes que no fueran candidatos a cirugía (por ejemplo, en lesiones grandes y difusas con márgenes mal definidos) o en recurrencias.

En la actualidad, muchos centros utilizan la quimioterapia tópica como terapia de primera línea. Los tres fármacos que se utilizan como quimioterapia tópica son: Interferón alfa 2b, 5-fluorouracilo y Mitomicina C. El más utilizado y con mayor evidencia en estudios retrospectivos es el Interferón, por lo que será el que utilizaremos en nuestro estudio.

En un estudio retrospectivo se compararon recurrencias y efectos adversos de las NESO en pacientes tratados de forma quirúrgica vs medica, encontrándose que no existe diferencia entre ambos tratamientos.³²

Interferón alfa 2-B

El Interferón alfa 2-B, es una proteína recombinante que pertenece a una familia de proteínas secretada por leucocitos, con propiedades antivirales y antineoplásicas.³³

Se ha reportado un éxito desde 80 a 100% como tratamiento primario de las NESO, de forma local. El tratamiento tópico consiste en administrar gotas a una concentración de 1 millón UI/ml cuatro veces al día hasta resolución, la cual se ha reportado en un promedio

de 3 meses. Cuando su administración es subconjuntival, se utiliza a una concentración de 3 millones de UI, inyectando 0.5ml una a tres veces por semana hasta resolución (promedio 1.4meses).³³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la prevalencia de p53, VPH16 y VPH18 en los casos de NESO?

¿La presencia de p53/VPH16/VPH18 en casos de NESO pueden determinar la respuesta a quimioterapia tópica con interferón alfa 2-B?

OBJETIVOS

Objetivo primario

Determinar la prevalencia de casos positivos a p53, VPH 16 y VPH 18 en NESO por medio de inmunohistoquímica.

Objetivos secundarios

1. Reportar las características demográficas de la población
2. Reportar los hallazgos clínicos
3. Reportar los hallazgos histopatológicos
4. Determinar la presencia de mutaciones del gen TP53 en pacientes con NESO utilizando secuenciación completa de exones.

5. Determinar la proporción de casos de eficacia al tratamiento con quimioterapia tópica
6. Determinar el tiempo de curación con la quimioterapia tópica
7. Comparar la presencia de p53 y VPH con la respuesta a quimioterapia tópica

HIPÓTESIS

Hipótesis primaria

La prevalencia de p53 será mayor o igual al 70% en los casos de NESO

La prevalencia de VPH 16 y 18 será mayor o igual al 30% en los casos de NESO

Hipótesis secundarias

La proporción de casos de eficacia al tratamiento con quimioterapia tópica será mayor o igual al 70%.

La presencia de p53 será un factor asociado a buena respuesta a quimioterapia tópica

La presencia de VPH no tendrá relación con la respuesta a quimioterapia tópica

MÉTODOS

Diseño del estudio

Universo: Pacientes que sean presentados a la Clínica de superficie ocular por probable NESO.

Unidad de observación: Ojo

Método de muestreo: Reclutamiento consecutivo.

Diseño del estudio: Serie de casos prospectiva.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Firma de consentimiento informado
3. Con signos clínicos de NESO (lesión conjuntival nodular, córnea opalescente, leucoplaquia, apariencia papilomatosa o gelatinosa y/o con vasos nutricios).
4. Con características típicas de NESO por HR-OCT (ver el apartado de diagnóstico).
5. Con capacidad de comprender el tratamiento y colocárselo adecuadamente.
6. Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. Invasión a esclera o intraocular por OCT y/o UBM
2. Tratamiento tópico previo
3. Tratamiento quirúrgico previo
4. Ojo único

Tamaño de la muestra

Se calculó mediante la fórmula de estimación de proporciones:

$$n = \frac{Z\alpha^2 PQ^2}{T^2}$$

$$Q = 1 - P$$

$Z\alpha$ = A dos colas: 1.96

T = 0.1 (10%)

P = HPV = 0.78 (78%)¹² N = 65.9 = 66

$P53$ = 0.75 (75%)¹² N = 72

* El tamaño de la muestra para el objetivo primario se determinó a conveniencia ($n=10$) con la finalidad de tener la secuenciación completa de exones de los casos.

Descripción general de los métodos

Después de la firma del consentimiento informado, se realizó la exploración oftalmológica completa y un interrogatorio dirigido (datos demográficos y posibles factores de riesgo). La información clínica recabada incluyó: edad a la presentación, sexo, raza, antecedentes personales patológicos y oftalmológicos, antecedente de exposición a luz ultravioleta, localización del tumor, área del tumor, características del tumor, grosor epitelial por HR-OCT y estadio clínico de la AJCC. A todos los casos se le tomó registro fotográfico de la lesión y HR-OCT.

Obtención y procesamiento de las muestras

Se colocó una gota de tetracaína en fondo de saco conjuntival (Ponti, Laboratorios Sophia) y se tomó una biopsia incisional en huso de espesor total de la conjuntiva, tomando la lesión con pinzas 0.12 y cortando el tejido con tijera de Wescott. Una vez tomada la muestra, se les indicó Tobramicina con Dexametasona qid por 7 días (Obrydex, Laboratorios Grin-Lupin).

La pieza fue enviada y procesada para:

- Diagnóstico histopatológico en el laboratorio de patología ocular
- p53, VPH16 y VPH18 por medio de inmunohistoquímica
- Un fragmento se congeló a -70°C para posterior obtención de DNA.

Al obtener la confirmación histopatológica de NESO, se inició tratamiento con Interferón alfa 2B tópico (1 millón U/ml) QID hasta resolución clínica y por HR-OCT. Una vez que se documenta resolución clínica, se deja terapia de mantenimiento durante dos meses más.

Durante las revisiones mensuales, se realizó la exploración oftalmológica completa, registro fotográfico de la lesión, renovación del medicamento si es el caso, toma de HR-OCT y registro de eventos adversos.

De cada espécimen obtenido, un fragmento fue enviado a examen histopatológico e inmunohistoquímica (fragmento 1) y otro se congeló a -70°C para posterior extracción de DNA.

Fragmento 1: diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímica.

Un fragmento de la muestra fue colocada y referida en una membrana vegetal, la cual se fijó en formol al 10%. Posteriormente, se procesaron los tejidos utilizando métodos estandarizados en el servicio de patología del hospital, realizándolos todos con la misma

metodología: deshidratación, aclaramiento e infiltración, por medio de un histoquinete (Leica TP1020) durante 14 horas (nocturno).

Después de su inclusión manual en parafina, se realizó la microtomía con un grosor de 3 micras, dado que es un tejido altamente celular. Las cintas se colocaron en baño de flotación con agua corriente, se separaron individualmente y se colocaron en láminas limpias previamente marcadas. Las láminas se dejaron escurrir verticalmente de 30 a 45 minutos y se colocaron acostadas a una temperatura de 60°C, en donde se mantuvieron toda la noche. A las laminillas obtenidas se les realizaron las tinciones con Hematoxilina-Eosina tradicional, las cuales fueron revisadas y clasificadas por dos patólogos oculares. Todas las lesiones con diagnóstico de NESO fueron incluidas en el estudio.

Los anticuerpos específicos dirigidos contra p53 y VPH se colocaron sobre el tejido y fueron calentados durante 4 minutos. Posterior a ello se introdujeron las laminillas con el tejido montado en el equipo Ventana Benchmark Ultra para realizar la técnica de inmunohistoquímica de forma automatizada. Los anticuerpos utilizados, la casa comercial, la clona y la dilución fueron los siguientes: anti-p53 BioSystem, dilución 1:50, y rabbit anti-VPH de alto riesgo DAKO, dilución 1:100.

La interpretación de los marcadores se llevó a cabo de la siguiente forma: se evaluaron 10 campos de 40X, tomándose como positiva si las células muestran tinción nuclear para ambos anticuerpos.

Fragmento 2: Análisis molecular

En el otro fragmento de tejido se realizó el procedimiento para la extracción de ADN total de los especímenes congelados utilizando el kit DNA Miniprep Plus Kit (ZYMO Research

Corporation, Orange CA, USA) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Una vez extraído y cuantificado mediante espectrofotometría, dichas muestras de ADN fueron enviadas a la Universidad de Miami para procesamiento y análisis de mutaciones de acuerdo a la metodología descrita en la investigación previa²², que se resume a continuación:

- Las secuencias fueron alineadas al genoma humano de referencia GRCh37/hg19 utilizando NovoAlign (Novocraft Technologies Sdn Bhd).
- Como no se recolectaron muestras de controles como parte del diseño del estudio, se creó un panel de muestras normales de una base de datos del Bascom Palmer Eye Institute. Ninguno de estos pacientes tenía antecedente o diagnóstico de padecimientos genéticos y se realizaron múltiples filtros para reducir la variabilidad genética, siendo el paso final un filtro más estricto basado en una publicación reciente de caracterización de genes y mutaciones (Comprehensive Characterization of Driver Genes and Mutations dataset)³⁴ para identificar mutaciones oncogénicas.
- Se crearon redes de interacción proteína-proteína de los genes mutados utilizando STRING (por sus siglas en inglés, Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins)³⁵.
- Las firmas mutacionales fueron analizadas utilizando polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés).³⁶

Definiciones operativas

Definición operativa de lesión sospechosa de NESO:

- Conjuntival: Lesión gelatinosa elevada, con vasos nutricios. Puede tener un aspecto papilomatoso y/o tener cambios leucopláquicos, en cualquier localización de la conjuntiva, cercana al limbo, que puede invadir córnea.

- Corneal: lesiones opalescentes, grisáceas, con márgenes digitiformes e irregulares, que pueden asociarse a lesiones conjuntivales.

Definición operativa de resolución: Desaparición clínica de la lesión, ausencia de vasos nutricios, aplanamiento de la conjuntiva, córnea clara. OCT sin datos característicos de NESO.

Definición operativa de fallo del tratamiento: Lesión persistente después de 6 meses de tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico utilizando SPSS versión 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Las variables demográficas se analizaron mediante estadística descriptiva. Se reportó la frecuencia de positividad a marcadores p53, VPH 16 y 18 y la proporción de resolución. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar diferencias estadísticas entre la positividad a P53 o VPH y la resolución, el grado histológico, los fenotipos clínicos, sexo, edad y antecedente de exposición a luz UV.

La significancia estadística se consideró cuando la p fue menor a 0.05.

ASPECTOS ÉTICOS

Este protocolo ha sido diseñado con base a los *Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos*, apegado a la Declaración de Helsinki y las buenas prácticas clínicas y de documentación. El consentimiento informado y protocolo fueron presentados y aprobados por el Comité de ética y el Comité de investigación local (Asociación para Evitar la Ceguera

en México, I.A.P.). Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado previo a cualquier maniobra o inclusión en el estudio.

RESULTADOS

Características demográficas y clínicas de la población

Se reclutaron 12 pacientes, todos identificados como mestizo mexicanos, de los cuales 58.3% (n=7) fueron del sexo masculino. La media de edad fue de 69.3 años (DE 11.7, 55-90). La mayor parte de los pacientes (58.3%, n=7) tenían una ocupación al aire libre (por ejemplo, obrero, campesino), y 66.7% (n=8) reportaron el antecedente de exposición intensa a luz solar a lo largo de su vida. La media del tiempo de evolución fue de 23.81 meses (DE 22.14, 2-60). La mayor parte de los tumores se localizó en el cuadrante temporal (66.7%, n=8), y la mayoría de los ojos incluidos fueron derechos (75%, n= 9), teniendo una media del área basal de 40.6mm² (DE 38.86, 8-130).

Un resumen de las características demográficas y clínicas de cada caso se presentan en la Tabla 5.

| ID | Edad años | Sexo | Exposición UV | Localización | Área | Diagnóstico | Estadio AJCC | Respuesta IFN |
|----|--------------|------|------------------|----------------|------------------------|-------------|-----------------|------------------|
| 1 | 83 | M | Sí | Superior OD | 130 mm ² | CIS | T3 | No |
| 2 | 61 | M | Sí | Temporal OD | 34 mm ² | CIS | T3 | Sí |

| | | | | | | | | |
|----|----|---|----|----------------|--------------------|------|----|----|
| 3 | 80 | M | No | Temporal OD | 20 mm ² | CIN1 | T3 | Sí |
| 4 | 56 | F | Sí | Nasal OD | 11 mm ² | CIN2 | T3 | Sí |
| 5 | 69 | M | Sí | Temporal OS | 62 mm ² | CIN1 | T3 | Sí |
| 6 | 63 | F | No | Temporal OD | 10 mm ² | CIN2 | T3 | Sí |
| 7 | 55 | F | No | Temporal OD | 78 mm ² | CIN1 | T3 | Sí |
| 8 | 90 | M | Sí | Temporal OD | 28 mm ² | CIN2 | T3 | No |
| 9 | 58 | M | Sí | Temporal OD | 25 mm ² | CIS | T3 | Sí |
| 10 | 75 | F | No | Nasal OS | 8 mm ² | CIS | T3 | Sí |
| 11 | 78 | F | Sí | Nasal OS | ND | CIS | T3 | No |
| 12 | 64 | M | Sí | Temporal OD | ND | CIS | T3 | Sí |

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de la población. Abreviaturas:

M=Masculino;F=Femenino; UV= Antecedente de exposición a luz UV, reportado por el paciente; AJCC, American Joint Committee on Cancer; HPV, Human Papilloma Virus; IFN, Interferon; OD, ojo derecho; OS, ojo izquierdo; CIS, Carcinoma in situ; CIN, Neoplasia Intraepitelial Conjuntival; ND No disponible.

Hallazgos por imagen e histopatológicos de las NESO

Al analizar la HR-OCT, todos los casos presentaron características clínicas típicas de NESO: hiper-reflectividad y engrosamiento epitelial mayor a 120 micras, así como la línea de transición abrupta entre epitelio sano y enfermo. La media de grosor epitelial fue de 227.6 (DE 89.1, 126-377). Además de los hallazgos clínicos descritos previamente, se encontró que el 100% de los tumores invadía el tejido corneal.

Como se presentó en la Tabla 5, el 100% de los tumores correspondía a un estadio T3 (AJCC). En cuanto a la clasificación histopatológica, la población se distribuyó de la siguiente manera:

- NIC I: 41.7% (n=5)
- NIC II: 25% (n=3)
- NIC III o carcinoma in situ: 33.3% (n=4)

Inmunodetección de p53

La prevalencia de p53 determinada por la señal positiva detectada mediante inmunohistoquímica (Figura 5) fue de 80% (n=8/10), y de VPH de 50% (n=8/10). Dos casos se eliminaron debido a que la muestra no fue adecuadamente procesada.

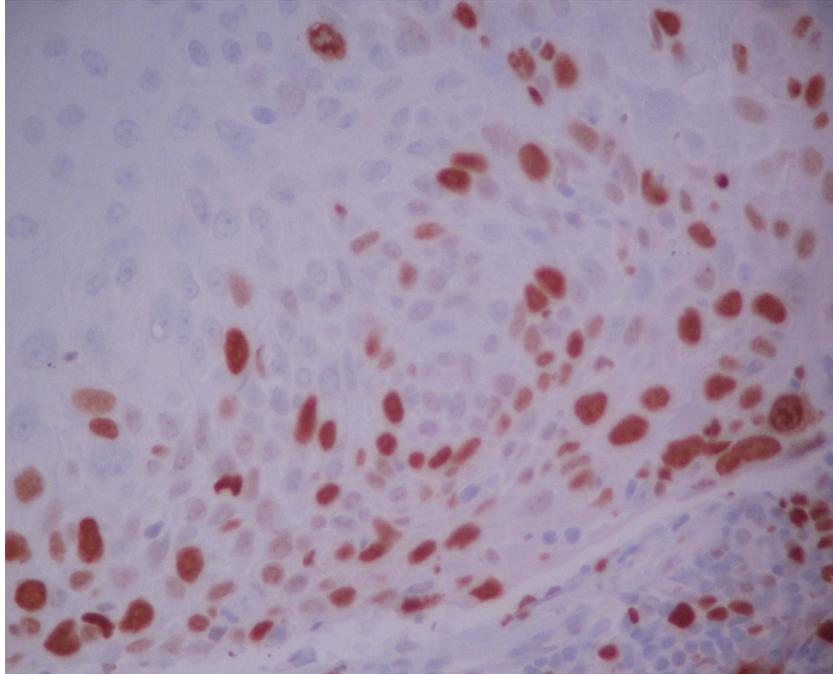


Figura 5. Fotomicrografía representativa a gran aumento que muestra una expresión nuclear positiva en células de las capas profundas y media del epitelio de revestimiento en una neoplasia de alto grado (NIC 2). (Inmunodetección de p53, amplificación original 40x).

Respuesta a tratamiento con IFN

El 75% de los casos (n=9/12) tuvo respuesta a quimioterapia tópica (figura 6), dos casos fueron considerados como tal debido a que, aunque presentaron cierta reducción en el tamaño, no cumplieron el seguimiento mínimo de 3 meses. La media de tiempo de respuesta a tratamiento fue de 5.83 meses (DE 1.85, 3-8 meses) y no se reportaron efectos adversos. El tiempo de seguimiento fue de 8.5 meses (SD 3.14, 3- 13 meses).

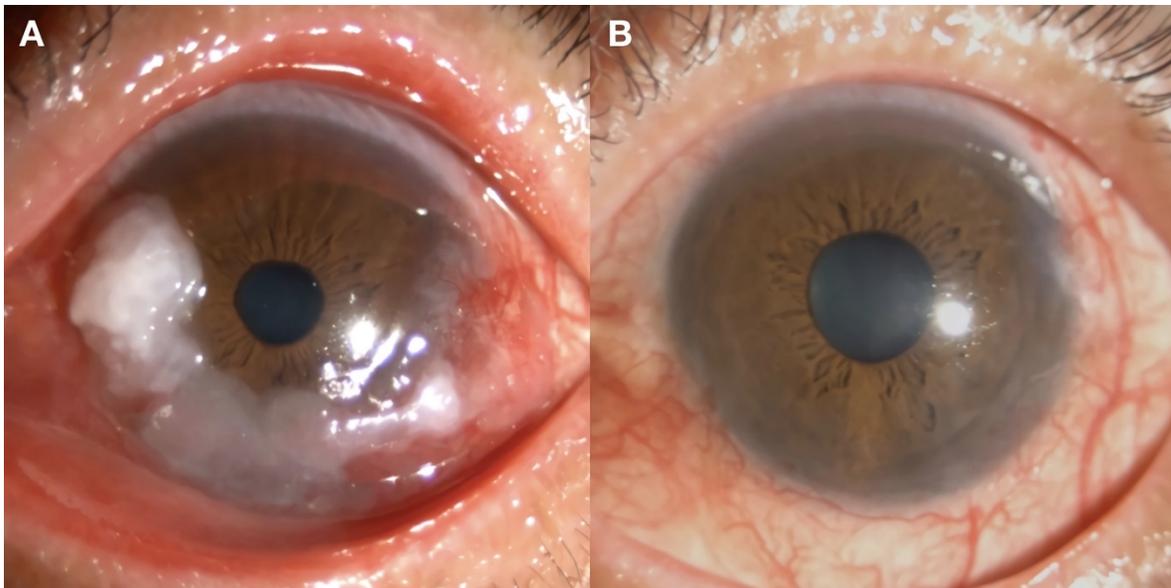


Figura 6. Apariencia clínica del ojo derecho de un paciente con NESO antes y después del tratamiento con IFN. A. Lesión conjuntival difusa y gelatinosa con leucoplaquia e involucro corneal antes del tratamiento (con diagnóstico histopatológico de carcinoma in situ). B. Apariencia después de 6 meses del tratamiento con interferón tópico.

Al comparar la presencia de P53 con la respuesta a quimioterapia tópica, se observó que 2 de los 3 casos no respondedores a IFN (66.7%) y 6 de 7 respondedores (85.71%) presentaron P53+, sin encontrarse significancia estadística ($p=0.18$, prueba exacta de Fisher).

En el caso de VPH, se encontró que 2 de los 3 casos no respondedores a IFN (66.7%) y 3 de 7 respondedores (42.86%) presentaron VPH+, sin encontrarse significancia estadística ($p=>0.9999$, prueba exacta de Fisher).

Análisis por secuenciación completa de exones

En el análisis por secuenciación completa de exones de estos pacientes ($n=10$) se encontraron 305 mutaciones. La mutación más frecuentemente encontrada fue en TP53 y HGF (ambas

presentes en el 50% de los casos), encontrándose como única firma mutacional en la base de datos aquella por mutagenesis inducida por luz ultravioleta (siendo el 100% la firma mutacional C > T) (Figura 7).

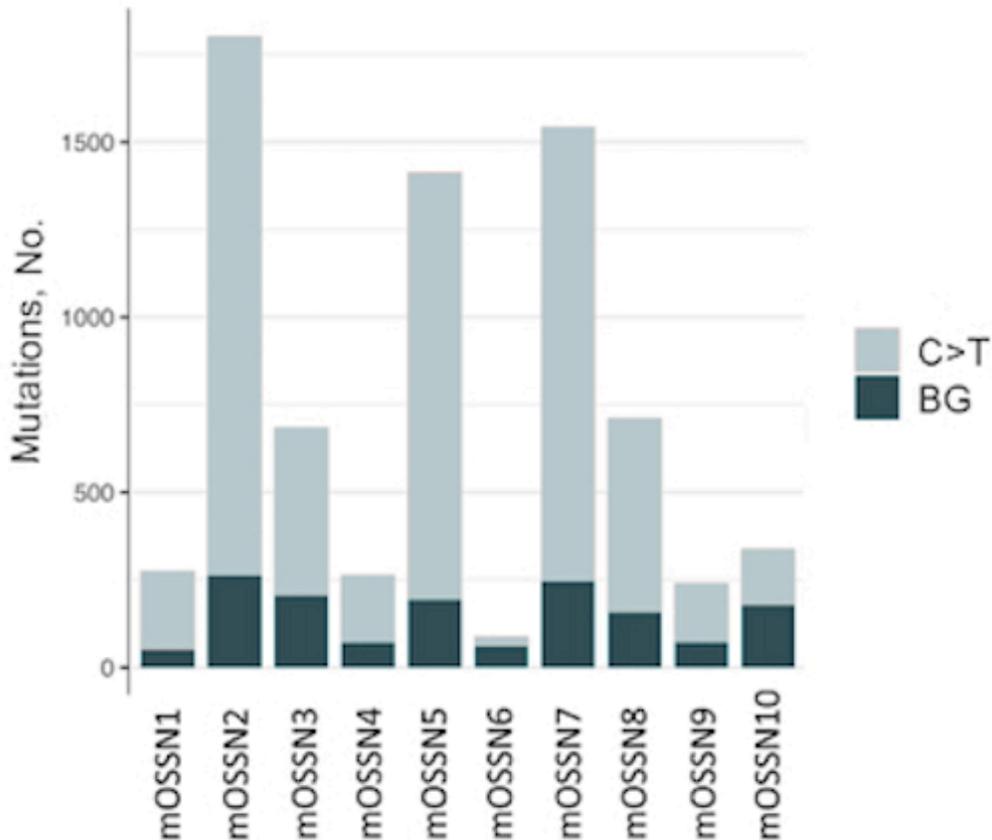


Figura 7. Análisis de firma mutacional demostrando la mutación (C > T) inducida por luz UV en las muestras de NESO. BG = Background signal.

Al comparar la presencia de la mutación en TP53 y la respuesta a tratamiento, sexo, edad, status de VPH y antecedente de exposición intensa a luz ultravioleta, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Es este estudio sobre NESO, encontramos una prevalencia de P53 de 80%, ligeramente mayor a la reportada en la literatura. Uno de los estudios más importantes en este tema es el de Mahomed et al,²⁰ de Sudáfrica, donde reportó una prevalencia del 75% de p53 en 41 especímenes de NESO. A diferencia de nuestra población (33.3%), el 87.5% de sus casos fueron carcinomas in situ o invasores, algunos de los casos asociados a VIH, lo cual implica que los tumores de su población fueron más agresivos.

En otro estudio realizado en Polonia, la prevalencia de p53 fue de 54.5% (n=11) en carcinomas escamosos de la superficie ocular³⁷, también en una serie de casos pequeña, lo cual puede deberse a la diferencia en localización geográfica y exposición a luz UV.

En 1996, Newton y colaboradores investigaron el riesgo de presentar carcinoma escamoso de acuerdo a la distribución geográfica. Encontraron que, por cada 10 grados de incremento en la latitud*, se reducía la incidencia de esta patología en un 49%. Con estos resultados se corroboró la hipótesis de que la exposición a la luz ultravioleta es una causa de NESO, describiéndose una relación directamente proporcional entre la latitud (exposición a luz UV-B) y la incidencia de estos tumores.³⁸ Así mismo, la piel clara, la propensión a quemaduras solares y el iris claro son factores de riesgo a considerar para el desarrollo de NESO.³⁹

La mutación en TP53, un gen reparador que participa activamente en la regulación del ciclo celular, fue la más frecuentemente encontrada en el estudio de secuenciación de exones (50% de los casos). Dicha mutación ha sido previamente descrita en NESO y es bien

* La latitud proporciona la localización de un lugar desde el ecuador y se expresa en medidas angulares que varían desde los 0° del Ecuador hasta los 90° de los polos norte y sur. Uganda, Singapur y Costa Rica son ejemplos de países en los 10° cercanos al Ecuador, donde se estima una alta incidencia de la enfermedad. México se encuentra entre las latitudes 32°N al Norte y 14°N en el Sur, la CDMX en la 19°N.

reconocido que promueve el desarrollo y la progresión de cáncer.^{2,37} En un estudio de 21 especímenes de NESO, el 52.4% (n=11) presentaron mutaciones en los exones 5-9 de TP53, de las cuales 7 mutaciones fueron transiciones C>T.⁴⁰ Se ha descrito que estas mutaciones pueden deberse a que la radiación solar UVB es un promotor conocido tanto de las mutaciones en TP53 como de NESO. La única “firma” mutacional presente en las muestras del presente estudio fue dicha mutación C>T inducida por luz UV. Este hallazgo, combinado con el antecedente de exposición intensa a luz UV en todos los casos positivos, soporta la idea de que la luz UV es un factor de riesgo mayor en la patogénesis de las NESO, y recalca la importancia de explicar y aconsejar a los pacientes sobre este riesgo con la finalidad de evitar recurrencias o la generación de nuevas lesiones en el ojo contralateral. Al comparar con el estudio previo en la población de Miami,²² no se encontró mutación en TP53 en dicha población. Esta disimilitud entre estudios puede deberse a que la población es bastante distinta en términos de raza (100% hispanos vs 30%). Por otro lado, los pacientes tenían una edad mayor (media de edad 69.3 ± 11.7 , vs 57.29 ± 15.41) y los tumores eran más grandes ($40.6\text{mm}^2 \pm 38.87$ vs $19.0\text{mm}^2 \pm 17.7$) en el presente estudio. Esto podría sugerir que, si no se tiene el tratamiento adecuado en estadios tempranos, el avance en la evolución del tumor puede resultar en un aumento en el número y tipo de mutaciones.

Los primeros casos de VPH en tumores conjuntivales fueron publicados en 1991 por Odrich et al, una serie de 3 carcinomas de células escamosas bilaterales.⁴¹ Los VPH son virus oncogénicos que han sido reportados en diversas neoplasias epiteliales, como el cervicouterino.⁴²

La prevalencia de VPH en nuestra población fue de 50%, valor similar a lo reportado en la literatura. En el estudio polaco mencionado previamente, la prevalencia reportada fue de

9.1%, y en 5 de 7 (71.4%) de estos tumores positivos a VPH también presentaron positividad a p53;³⁷ en nuestra población 3 de 4 tumores (75%) positivos a p53 presentaron positividad a VPH, apoyando la idea de que el VPH puede ser un cofactor en el desarrollo y/o progresión de las NESO. En otro estudio con 21 casos de carcinoma de células escamosas y 22 controles, el VPH estuvo presente en 86% y 36% respectivamente, encontrando un Odds Ratio de -12 y sugiriendo el rol del virus en la etiología de las NESO.⁴³ Sin embargo, en otros estudios no se ha encontrado VPH en este tipo de tumores.⁴⁴

Cabe mencionar que la metodología para la detección de VPH ha sido muy diversa en la literatura, utilizando inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la técnica de hibridación in situ y la frecuencia de VPH varía desde 0 hasta 100%.⁴⁵

La relación entre la respuesta a quimioterapia tópica y la presencia de VPH y p53 ha sido evaluada previamente en un estudio retrospectivo que incluyó 27 casos con NESO, conducido en Miami, encontrándose positividad a VPH en 78% y P53 n 70% de los casos.⁴⁵ Similar a nuestro estudio, no se encontró relación entre la presencia de VPH y P53 y la respuesta a quimioterapia tópica con IFNalfa-2b.

Reconocemos que una de las principales limitaciones del estudio para probar las hipótesis secundarias es el reducido tamaño de la muestra. Además de ello, la presencia de sólo tres pacientes que no respondieron a IFNalfa-2b hace difícil el análisis y la interpretación de factores que promueven la falta de respuesta a tratamiento. Por ese motivo y que la tasa de respuesta a quimioterapia tópica es bastante alta (desde 70 hasta 95%), para responder a dichas preguntas de investigación se deberá incrementar el tamaño de la muestra e incluir a un mayor número de no-respondedores a quimioterapia tópica.

Después de iniciar este proyecto de investigación, se generaron múltiples hipótesis y se crearon colaboraciones con otras instituciones. A lo largo del tiempo, se ha conformado una

cohorte de neoplasias de superficie ocular y nos hemos ubicado como un centro de referencia a nivel nacional. El desarrollo de fármacos y ensayos clínicos dirigidos a la maquinaria de reparación del ADN está al frente en la investigación básica y clínica del cáncer,⁴⁶ por lo que estudios derivados de este proyecto inicial podrán contribuir a probar opciones terapéuticas para NESO en el futuro.

CONCLUSIONES

A pesar de sus limitaciones, este estudio nos permitió obtener la prevalencia de p53 y VPH en los pacientes con NESO.

Existe una alta frecuencia de p53 determinada mediante inmunohistoquímica y por secuenciación completa de exones,

Se sugiere que las causas podrían ser la exposición a la luz UV como factor patogénico por alteración en la reparación del DNA y las alteraciones secundarias en el ciclo celular como se ha sugerido previamente en otros estudios.

Es necesaria la realización de más estudios sobre la participación de P53 como fundamento en nuevas opciones terapéuticas para NESO.

REFERENCIAS

1. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* Apr 2007;5(2):75-92. doi:10.1016/s1542-0124(12)70081-2
2. Gichuhi S, Ohnuma S, Sagoo MS, Burton MJ. Pathophysiology of ocular surface squamous neoplasia. *Exp Eye Res.* Dec 2014;129:172-82. doi:10.1016/j.exer.2014.10.015
3. Lee GA, Hirst LW. Ocular surface squamous neoplasia. *Surv Ophthalmol.* May-Jun 1995;39(6):429-50.
4. McClellan AJ, McClellan AL, Pezon CF, Karp CL, Feuer W, Galor A. Epidemiology of Ocular Surface Squamous Neoplasia in a Veterans Affairs Population. *Cornea.* Oct 2013;32(10):1354-8. doi:10.1097/ICO.0b013e31829e3c80
5. Shields CL, Chien JL, Surakiatchanukul T, Sioufi K, Lally SE, Shields JA. Conjunctival Tumors: Review of Clinical Features, Risks, Biomarkers, and Outcomes--The 2017 J. Donald M. Gass Lecture. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2017 Mar-Apr 2017;6(2):109-120. doi:10.22608/APO.201710
6. Mudhar HS. Update on conjunctival pathology. *Indian J Ophthalmol.* Sep 2017;65(9):797-807. doi:10.4103/ijo.IJO_364_16
7. Gichuhi S, Sagoo MS, Weiss HA, Burton MJ. Epidemiology of ocular surface squamous neoplasia in Africa. *Trop Med Int Health.* Dec 2013;18(12):1424-43. doi:10.1111/tmi.12203
8. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/default.aspx>

9. Organization PH. Cancer profile in Mexico.
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51536-mexico-cancer-profile-2020&Itemid=270<=es
10. Capiz Correa DR, García Córdoba T, Tejeda Rojas G, Lozano Alcazar J, Perez-Cano HJ. Características del carcinoma epidermoide de conjuntiva en un hospital de concentración oftalmológico en México. *Revista Mexicana de Oftalmología*. 2017;91(3):142-147. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mexoft.2016.04.012>
11. Orrostieta-Olvera V, Ruiz-Galindo E, Muñoz-Gutiérrez G. Correlación clínico-patológica en neoplasia escamosa de superficie ocular. Estudio de 32 casos tratados quirúrgicamente. *Cir Cir*. 2008;76(6):641-645.
12. Ramos-Betancourt N, Rodríguez-Pedraza J, Rodríguez-Reyes A, Beltrán-Díaz de la Vega F, Terán-Tejada A, Hernández-Quintela E. Epidemiology of Ocular Surface Squamous Neoplasia in an Ophthalmology Center in Mexico City. presented at: ARVO Annual Meeting; 2016; Seattle, Wash., USA. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* September 2016, Vol.57, 2401
13. Sayed-Ahmed IO, Palioura S, Galor A, Karp CL. Diagnosis and Medical Management of Ocular Surface Squamous Neoplasia. *Expert Rev Ophthalmol*. 2017;12(1):11-19. doi:10.1080/17469899.2017.1263567
14. Scott IU, Karp CL, Nuovo GJ. Human papillomavirus 16 and 18 expression in conjunctival intraepithelial neoplasia. *Ophthalmology*. Mar 2002;109(3):542-7. doi:10.1016/s0161-6420(01)00991-5
15. Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*. Apr 1 2005;571(1-2):19-31. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.057

16. Besaratinia A, Yoon JI, Schroeder C, Bradforth SE, Cockburn M, Pfeifer GP. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB J*. Sep 2011;25(9):3079-91. doi:10.1096/fj.11-187336
17. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*. Oct 25 1999;263(2):388-94. doi:10.1006/viro.1999.9950
18. Shanmuganathan VA, Foster T, Kulkarni BB, et al. Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. *Br J Ophthalmol*. Apr 2007;91(4):514-9. doi:10.1136/bjo.2006.102640
19. Basti S, Macsai MS. Ocular surface squamous neoplasia: a review. *Cornea*. Oct 2003;22(7):687-704.
20. Mahomed A, Chetty R. Human immunodeficiency virus infection, Bcl-2, p53 protein, and Ki-67 analysis in ocular surface squamous neoplasia. *Arch Ophthalmol*. May 2002;120(5):554-8.
21. Kobalka PJ, Abboud JP, Liao X, et al. p16INK4A expression is frequently increased in periorbital and ocular squamous lesions. *Diagn Pathol*. Sep 2015;10:175. doi:10.1186/s13000-015-0396-8
22. Galor A, Karp CL, Sant D, et al. Whole Exome Profiling of Ocular Surface Squamous Neoplasia. *Ophthalmology*. Jan 2016;123(1):216-217.e1. doi:10.1016/j.ophtha.2015.06.049
23. Woreta F, Karp C. Ocular Surface Neoplasias. In: Holland E, Mannis M, Lee W, eds. *Ocular Surface Disease*. Elsevier Saunders; 2013.

24. Gupta A, Muecke J. Treatment of ocular surface squamous neoplasia with Mitomycin C. *Br J Ophthalmol*. May 2010;94(5):555-8. doi:10.1136/bjo.2009.168294
25. Ong SS, Vora GK, Gupta PK. Anterior Segment Imaging in Ocular Surface Squamous Neoplasia. *J Ophthalmol*. 2016;2016:5435092. doi:10.1155/2016/5435092
26. Romero IL, Barros JeN, Martins MC, Ballalai PL. The use of 1% toluidine blue eye drops in the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia. *Cornea*. Jan 2013;32(1):36-9. doi:10.1097/ICO.0b013e318243f61f
27. Gichuhi S, Macharia E, Kabiru J, et al. Toluidine Blue 0.05% Vital Staining for the Diagnosis of Ocular Surface Squamous Neoplasia in Kenya. *JAMA Ophthalmol*. Nov 2015;133(11):1314-21. doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.3345
28. Kieval JZ, Karp CL, Abou Shousha M, et al. Ultra-high resolution optical coherence tomography for differentiation of ocular surface squamous neoplasia and pterygia. *Ophthalmology*. Mar 2012;119(3):481-6. doi:10.1016/j.ophtha.2011.08.028
29. Nanji AA, Sayyad FE, Galor A, Dubovy S, Karp CL. High-Resolution Optical Coherence Tomography as an Adjunctive Tool in the Diagnosis of Corneal and Conjunctival Pathology. *Ocul Surf*. Jul 2015;13(3):226-35. doi:10.1016/j.jtos.2015.02.001
30. Finger PT, Tran HV, Turbin RE, et al. High-frequency ultrasonographic evaluation of conjunctival intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Arch Ophthalmol*. Feb 2003;121(2):168-72. doi:10.1001/archopht.121.2.168
31. Duchateau N, Hugol D, D'Hermies F, et al. [Contribution of in vivo confocal microscopy to limbal tumor evaluation]. *J Fr Ophthalmol*. Oct 2005;28(8):810-6. doi:10.1016/s0181-5512(05)80998-2
32. Nanji AA, Moon CS, Galor A, Sein J, Oellers P, Karp CL. Surgical versus medical treatment of ocular surface squamous neoplasia: a comparison of recurrences and

- complications. *Ophthalmology*. May 2014;121(5):994-1000.
doi:10.1016/j.optha.2013.11.017
33. Holland EJ, M.J. M, Lee WB. *Ocular Surface Disease*. Elsevier; 2013.
34. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*. 04 05 2018;173(2):371-385.e18.
doi:10.1016/j.cell.2018.02.060
35. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 01 04 2017;45(D1):D362-D368. doi:10.1093/nar/gkw937
36. Shiraishi Y, Tremmel G, Miyano S, Stephens M. A Simple Model-Based Approach to Inferring and Visualizing Cancer Mutation Signatures. *PLoS Genet*. Dec 2015;11(12):e1005657. doi:10.1371/journal.pgen.1005657
37. Joanna R, Renata Z, Witold P, Małgorzata S, Bernaczyk P, Chyczewski L. The evaluation of human papillomavirus and p53 gene mutation in benign and malignant conjunctiva and eyelid lesions. *Folia Histochem Cytobiol*. Dec 2010;48(4):530-3.
doi:10.2478/v10042-010-0081-4
38. Newton R, Ferlay J, Reeves G, Beral V, Parkin DM. Effect of ambient solar ultraviolet radiation on incidence of squamous-cell carcinoma of the eye. *Lancet*. May 1996;347(9013):1450-1. doi:10.1016/s0140-6736(96)91685-2
39. Lee GA, Williams G, Hirst LW, Green AC. Risk factors in the development of ocular surface epithelial dysplasia. *Ophthalmology*. Feb 1994;101(2):360-4.
doi:10.1016/s0161-6420(94)31328-5

40. Ateenyi-Agaba C, Dai M, Le Calvez F, et al. TP53 mutations in squamous-cell carcinomas of the conjunctiva: evidence for UV-induced mutagenesis. *Mutagenesis*. Sep 2004;19(5):399-401. doi:10.1093/mutage/geh048
41. Odrich MG, Jakobiec FA, Lancaster WD, et al. A spectrum of bilateral squamous conjunctival tumors associated with human papillomavirus type 16. *Ophthalmology*. May 1991;98(5):628-35. doi:10.1016/s0161-6420(91)32218-8
42. Kiire CA, Dhillon B. The aetiology and associations of conjunctival intraepithelial neoplasia. *Br J Ophthalmol*. Jan 2006;90(1):109-13. doi:10.1136/bjo.2005.077305
43. Ateenyi-Agaba C, Weiderpass E, Smet A, et al. Epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types and carcinoma of the conjunctiva: a pilot study. *Br J Cancer*. May 2004;90(9):1777-9. doi:10.1038/sj.bjc.6601743
44. Eng HL, Lin TM, Chen SY, Wu SM, Chen WJ. Failure to detect human papillomavirus DNA in malignant epithelial neoplasms of conjunctiva by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*. Mar 2002;117(3):429-36. doi:10.1309/RVUP-QMU3-5X6W-3CQ1
45. Galor A, Garg N, Nanji A, et al. Human Papilloma Virus Infection Does Not Predict Response to Interferon Therapy in Ocular Surface Squamous Neoplasia. *Ophthalmology*. Nov 2015;122(11):2210-5. doi:10.1016/j.ophtha.2015.07.007
46. Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol*. May 2014;10(7):1215-37. doi:10.2217/fon.14.60

Abreviaturas (en orden alfabético)

| | |
|-----------------|--|
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| CE | Carcinoma epidermoide (o de células escamosas) |
| HR-OCT | Tomografía de coherencia óptica de alta resolución |
| IFN α 2b | Interferón alfa 2b. |
| NESO | Neoplasia escamosa de la superficie ocular |
| NIC | Neoplasia intraepitelial corneal/conjuntival |
| TIEE | Tasa de incidencia estandarizada por edad |
| UBM | Ultrabiomicroscopía del segmento anterior |