

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA**

**DEPARTAMENT DE CIRURGIA**

**TESIS DOCTORAL**

***ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE  
LA QUIMIOCINA CXCL12 Y SU RECEPTOR CXCR4 EN EL  
MELANOMA MALIGNO DE ÚVEA Y SU ASOCIACIÓN CON  
OTROS FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS CONOCIDOS***

**Catalina Esmerado Appiani**

Barcelona 2006

**JOSÉ GARCÍA ARUMÍ**, profesor titular de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Oftalmología del Hospital Vall d'Hebron,

**CERTIFICO:** que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la expresión inmunohistoquímica de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en el melanoma maligno de úvea y su asociación con otros factores clínico-patológicos conocidos”, realizada por la licenciada Dña. CATALINA ESMERADO APPIANI y dirigida por mí y el Dr. Alfredo Adán , reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa.

Y para que conste firmo el presente certificado en Barcelona, a veintiuno de Abril del dos mil seis.

**Dr. José García Arumí**

**ALFREDO ADÁN CIVERA**, profesor titular de la Universidad de Barcelona y Jefe de Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona,

**CERTIFICO:** que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la expresión inmunohistoquímica de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en el melanoma maligno de úvea y su asociación con otros factores clínico-patológicos conocidos”, realizada por la licenciada Dña. CATALINA ESMERADO APPIANI y dirigida por mí y el Dr. José García Arumí , reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa.

Y para que conste firmo el presente certificado en Barcelona, a veintiuno de Abril del dos mil seis.

**Dr. Alfredo Adán Civera**

A mis padres, por haberme transmitido la importancia del estudio, el poder del lenguaje y la fuerza de la escritura.

A Ramon, por compartir ilusiones e inquietudes, por su apoyo incondicional y sobretodo, por querer y saber hacerme feliz a diario.

Y a mi hija Alexia, por ser lo más maravilloso que me ha ocurrido.

- A Miguel Burnier por haberme abierto las puertas del mundo de la investigación al más alto nivel. Sin él esta tesis no hubiese sido posible. Me brindó la oportunidad de vivir una experiencia única e inolvidable de la que le estaré siempre agradecida. Representa una fuente inagotable de conocimiento que ha marcado mi trayectoria profesional y vida personal. No quiero olvidarme de su mujer Nora, una persona excepcional y una referencia a seguir.
- A todas y cada una de las personas que forman el equipo del “*Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory*” por haber compartido conmigo su cariño, experiencia y conocimientos. Han sido muchas horas de duro trabajo, experimentos, tertulias, almuerzos y celebraciones juntos. Un agradecimiento especial para Sonia, Emilia y Alex por su profesionalidad y la amistad que me regalaron.
- Al Dr. Alfredo Adán por haber creído en mi proyecto desde un principio, haberme alentado a realizarlo y brindado todo el apoyo necesario desde la distancia.
- Al Dr. García-Arumí por su contribución en la elaboración de mi tesis. Su ayuda ha demostrado ser indispensable en la culminación de ésta.
- A Miguel Carballo por sus tan sabios y acertados consejos. Representa un pilar básico en mi formación científica por su profesionalidad y calidad humana.
- Al servicio de Oftalmología del Hospital de Terrassa por haber contribuido en mi formación como oftalmóloga. Un recuerdo especial por su compañerismo para Anabel, Imma, JJ, Pepe y Marta.
- A todo el equipo de Teknoftal por sus continuas muestras de apoyo y comprensión.
- A mis nuevos compañeros del servicio de Oftalmología del Hospital de Viladecans por su gran acogida.

- A la Societat Catalana d'Oftalmologia por fomentar y recompensar el deseo por la investigación entre jóvenes oftalmólogos.
- A mis hermanos, Ornella y Luis M<sup>a</sup>, que durante la elaboración de la tesis han representado la presencia en mi ausencia.
- A mis grandes amigas Cristina, Anna y María con las que espero seguir compartiendo éxitos, fracasos, alegrías y penas.
- Y a mis compañeros de la Facultad de Medicina por la gran amistad que nos une.

# ÍNDICE CONTENIDO

---

ÍNDICE CONTENIDO.....	10
ÍNDICE TABLAS .....	14
ÍNDICE FIGURAS .....	17
ÍNDICE ABREVIATURAS .....	20
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
1.1 MELANOMA DE ÚVEA .....	24
1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	24
1.1.2 FACTORES DE RIESGO .....	24
a. Edad .....	24
b. Sexo .....	25
c. Raza y Factores geográficos.....	25
d. Exposición solar.....	25
e. Factores genéticos .....	25
f. Lesiones predisponentes .....	27
1.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	28
1.1.4 DIAGNÓSTICO .....	31
1.1.5 METÁSTASIS EN MELANOMA MALIGNO DE ÚVEA.....	33
1.1.6 FACTORES PRONÓSTICOS.....	35
a. Factores pronósticos clínicos .....	35
Localización .....	35
Tamaño .....	35
Patrón de crecimiento.....	36
Extensión extraescleral.....	36
b. Factores pronósticos histopatológicos.....	36
Tipo celular .....	36
Actividad mitótica.....	38
Patrones vasculares .....	38
Infiltración linfocítica tumoral (ILT) .....	40
Núcleo y nucleolo .....	41
1.1.7 TRATAMIENTO DEL MELANOMA DE ÚVEA.....	41

1.2 METÁSTASIS .....	43
1.2.1 PATOGÉNESIS DE LA METÁSTASIS .....	43
1.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO METASTÁSICO .....	44
a. Potencial metastásico .....	44
b. Especificidad metastásica .....	44
c. Progresión neoplásica.....	46
d. Insuficiencia metastásica.....	46
e. Estado durmiente.....	47
1.3 QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.....	48
1.3.1 GENERALIDADES .....	48
a. Quimiocinas .....	48
(i) Clasificación .....	48
(ii) Fuentes celulares .....	50
(iii) Efectos biológicos .....	51
b. Receptores de quimiocinas.....	51
1.3.2 FUNCIONES DE LAS CXC QUIMIOCINAS EN HUMANOS.....	52
1.3.3 QUIMIOCINAS Y TUMORES.....	54
1.3.4 QUIMIOCINA CXCL12 Y SU RECEPTOR CXCR4.....	58
1.3.5 CXCR4/CXCL12 Y MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO.....	61
1.3.6 CXCR4/CXCL12 Y MELANOMA MALIGNO DE ÚVEA .....	62
1.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA .....	63
1.5 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	63
1.5.1 Coloración de hematoxilina-eosina (H&E) .....	64
1.5.2 Ácido Periódico-Schiff.....	64
1.6 INMUNOHISTOQUÍMICA .....	64
1.6.1 Tipos de anticuerpos .....	65
1.6.2 Técnicas de IHQ .....	65
1.6.3 IHQ enzimática.....	65
1.6.4 Aspectos técnicos de la IHQ enzimática.....	66
<b>2. PROPÓSITO .....</b>	<b>68</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>70</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>72</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>

5.1 SUJETOS .....	75
5.2 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	75
5.3 INMUNOHISTOQUÍMICA .....	78
5.4 CLASIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CXCR4 Y CXCL12.....	80
5.5 ESTUDIO DE VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS .....	81
5.5.1 Tipo celular.....	81
5.5.2 Infiltración linfocítica tumoral.....	81
5.5.3 Círculos vasculares cerrados.....	81
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	82
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS .....	84
6.2. INMUNOHISTOQUÍMICA .....	87
6.3 EXPRESIÓN DE CXCR4 Y CXCL12 .....	90
6.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 Y CXCL12 .....	90
6.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN CXCR4 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS.....	91
6.6 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCL12 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS.....	93
6.7 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 Y CXCL12 Y LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	94
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>8. PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>107</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>109</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>111</b>



## ÍNDICE TABLAS

---

<b><u>Tabla 1</u></b> : <i>Quimiocinas CXC, CC, C, CX3C y sus receptores. Nomenclatura actual, antigua, localización cromosómica de los genes codificantes para cada una de ellas y sus receptores</i> .....	49
<b><u>Tabla 2</u></b> : <i>Principales funciones biológicas de la interacción quimiocina-receptor en el proceso neoplásico</i> .....	54
<b><u>Tabla 3</u></b> : <i>Protocolo Tinción Hematoxilina-Eosina</i> .....	76
<b><u>Tabla 4</u></b> : <i>Protocolo Tinción Ácido Periódico Schiff (PAS)</i> .....	77
<b><u>Tabla 5</u></b> : <i>Protocolo Inmunohistoquímica CXCR4 y CXCL12. IHQ enzimática. Método ABC (Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa)</i> .....	79
<b><u>Tabla 6</u></b> : <i>Resumen de los datos demográficos observados para las diferentes variables</i> .....	85
<b><u>Tabla 7</u></b> : <i>Inmunorreactividad de CXCR4 y CXCL12</i> .....	90
<b><u>Tabla 8</u></b> : <i>Correlación inmunorreactividad CXCR4 y CXCL12</i> .....	91
<b><u>Tabla 9</u></b> : <i>Frecuencia de metástasis de acuerdo con la expresión de CXCR4</i> .....	91
<b><u>Tabla 10</u></b> : <i>Frecuencia de metástasis de acuerdo con la expresión de CXCL12</i> .....	93

**Tabla 11:** *Estudio de la asociación entre la expresión de CXCR4 y los parámetros clínico-patológicos ..... 95*

**Tabla 12:** *Estudio de la asociación entre la expresión de CXCL12 y los parámetros clínico-patológicos ..... 96*



## ÍNDICE FIGURAS

---

### **Figura 1**

*Melanoma de úvea. (A) Aspecto clínico del melanoma de iris. (B) Aspecto macroscópico del melanoma del cuerpo ciliar. (C) Aspecto clínico del melanoma de coroides. (D) Aspecto macroscópico del melanoma de coroides. .... 30*

### **Figura 2A**

*Aspectos microscópicos del melanoma de úvea. Células fusiformes (H&E, magnificación original 400x)..... 37*

### **Figura 2B**

*Aspectos microscópicos del melanoma de úvea. Células epitelioides (H&E, magnificación original 400x)..... 38*

### **Figura 3**

*Implicación de las quimiocinas en los procesos fisiológicos y patológicos..... 53*

### **Figura 4**

*(A) Círculo vascular cerrado (PAS, magnificación original 200x). (B) Infiltración tumoral linfocitaria (H&E, magnificación original 200x)..... 86*

### **Figura 5**

*Positividad para CXCL12. (A) Positividad intensa en células de morfología fusiforme (magnificación original 560x) (B) Positividad intensa en células de morfología epitelioides (magnificación original 560x). (C) Positividad intensa de distribución difusa (magnificación original 25x). (D) Positividad intensa de distribución focal (magnificación original 200x). (E) Control de positividad (lengua, magnificación original 100x). .... 88*

### **Figura 6**

*Positividad para CXCR4 (A) Positividad de intensidad media en células de morfología fusiforme (magnificación original 560x) (B) Positividad intensa en células de morfología epitelioides (magnificación original 400x). (C) Positividad intensa de distribución difusa (magnificación original 25x). (D) Positividad intensa en área con melanina (magnificación original 100x). (E) Control de positividad (SNC, magnificación original 200x). .... 89*

**Figura 7**

*Curvas de incidencia acumulada de metástasis de los grupos 1 y 2 de expresión de CXCR4..... 92*

**Figura 8**

*Curvas de incidencia acumulada de metástasis de los grupos 1 y 2 de expresión de CXCL12..... 94*



## ÍNDICE ABREVIATURAS

---

AEC	3-amino-9-etil-carbazol
bFGF	Factor de crecimiento fibroblasto básico
BSA	Albúmina sérica bovina
CCM	Células circulantes malignas
CGA	Campos de gran aumento
COMS	<i>Collaborative Ocular Melanoma Study</i>
CVC	Círculo vascular cerrado
DAB	Diaminobenzidina
DSAN	Desviación estándar del área nucleolar
ENE	Enolasa neuronal específica
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERK	Kinasa de regulación extracelular
ERL	Ácido glutámico-Leucina-Arginina
H&E	Hematoxilina-eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Cloruro de hidrógeno
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IHQ	Inmunohistoquímica
ILT	Infiltración linfocítica tumoral
DBT	Diámetro basal tumoral
MAPK	Proteína Kinasas Activadas por Mitógenos
MLN	Media de los 10 nucleolos más largos
MMP9	Metaloproteinasa 9
NF1	Neurofibrosis tipo 1
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amonio
PAS	Ácido periódico de Schiff
RMN	Resonancia magnética nuclear
RTA	Radioterapia

SDF1- $\alpha$	<i>Stromal Cell Derived Factor 1- alpha</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SND	Síndrome del nevus displásico
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TAC	Tomografía computerizada
TBS	Solución salina tamponada de Tris
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alpha
TTT	Termoterapia transpupilar
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>



# **1. INTRODUCCIÓN**

---

## **1.1 MELANOMA DE ÚVEA**

### **1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA**

El melanoma maligno de úvea es el tumor primario intraocular más frecuente entre la población adulta (McLean, Armed Forces Institute of Pathology (U.S.) y col. 1994) y el segundo melanoma humano tras el melanoma cutáneo (Chang, Karnell y col. 1998). En realidad se trata de un tumor maligno poco frecuente cuya incidencia se estima en 6 casos por millón de habitantes por año (Egan, Seddon y col. 1988; Singh y Topham 2003). Al contrario que en el melanoma cutáneo, la incidencia del melanoma uveal se ha mantenido estable en las últimas cinco décadas (Singh y Topham 2003). El 85% de los melanomas oculares son melanomas de úvea, dentro de los cuales el melanoma de coroides es el más frecuente (90%), seguido por el melanoma del cuerpo ciliar (7%) y por último el melanoma de iris (3%) (Damato 2004).

### **1.1.2 FACTORES DE RIESGO**

La etiología del melanoma maligno de úvea es desconocida aunque varios factores de riesgo se han visto involucrados en el desarrollo de la enfermedad (Singh, Shields y col. 2001).

#### **a. Edad**

El riesgo de melanoma de úvea se incrementa con la edad. La edad media de los enfermos a la hora del diagnóstico se sitúa en los 55 años (Raivio 1977). Es un tumor poco frecuente en niños y adolescentes. En menos del 1% de los casos el paciente tiene una edad inferior a 20 años (Singh, Shields y col. 2000) y la forma congénita es extremadamente rara (Broadway, Lang y col. 1991).

b. Sexo

Los hombres poseen un mayor riesgo de desarrollar un melanoma uveal que las mujeres (Egan, Seddon y col. 1988).

c. Raza y Factores geográficos

El melanoma de úvea es mucho más frecuente en la población caucásica que en la raza negra o asiática (Egan, Seddon y col. 1988). Se estima que los individuos blancos tienen hasta 150 veces más posibilidades de desarrollar un melanoma de úvea que los negros (Singh y Topham 2003). Entre los caucásicos, los individuos de piel clara, cabello rubio e iris azul poseen el riesgo más elevado (Gallagher, Elwood y col. 1985; Saornil 2004). Esto también explica las diferencias geográficas del tumor alrededor del mundo, donde los países escandinavos tienen una alta incidencia de melanoma de úvea mientras que en África el número de casos es muy bajo (Miller, Abrahams y col. 1981).

d. Exposición solar

Al contrario que en el melanoma cutáneo, el papel que juega la exposición solar en desarrollo del melanoma uveal no queda claro. Algunos autores defienden la existencia de una relación entre la influencia de luz ultravioleta y la aparición del tumor (Tucker, Shields y col. 1985; Vajdic, Krickler y col. 2002), mientras que otros no han podido encontrar asociación alguna (Seddon, Gragoudas y col. 1990; Dolin, Foss y col. 1994; Vajdic, Krickler y col. 2002; Singh, Rennie y col. 2004).

e. Factores genéticos

La mayoría de los casos de melanoma de úvea son esporádicos. En menos del 1% de los pacientes existe una historia familiar de melanoma uveal (Singh, Wang y col. 1996) y su asociación con otros cánceres es débil (Turner, Siatkowski y col. 1989).

El *síndrome del nevus displásico* (SND), esporádico o familiar, se caracteriza por la aparición durante la infancia y adolescencia de un gran número de nevus cutáneos atípicos (generalmente más de 100) con alto riesgo de transformación maligna. Se estima que el riesgo de desarrollar un melanoma cutáneo en las personas afectas es de un 10%, pudiendo alcanzar el 100% en algunas formas familiares (Greene, Clark y col. 1985). Estos pacientes tienen también una mayor incidencia de nevus conjuntivales y uveales (Toth-Molnar, Olah y col. 2004) y melanomas de úvea, cuya histología suele corresponder a la de peor pronóstico (Toth-Molnar, Hammer y col. 2000). Debido al hecho que los melanocitos cutáneos y uveales poseen el mismo origen embriológico en la cresta neural, se ha formulado la hipótesis de que los pacientes con SND poseen alguna alteración genética que predispone a la proliferación y malignización de ambos tipos de células.

Varios autores también han propuesto una asociación con la *neurofibromatosis tipo 1* (NF1) basándose en su origen común en la cresta neural y en la elevada incidencia de nevus coroideos en los pacientes con NF1. A pesar de estas teorías, la coexistencia de melanoma de úvea y NF1 es muy rara (Friedman y Margo 1998; Rehany y Rumelt 1999) y no permite establecer una relación causal entre ellas (Honavar, Singh y col. 2000).

Actualmente se están estudiando ciertas condiciones cromosómicas y moleculares que parecen estar asociadas con el melanoma de úvea y su historia natural, como son las alteraciones en los cromosomas 3, 6 y 8, en los genes p53 y Rb o en la ruta de señalización de MAPK. Investigaciones citogenéticas han demostrado que las alteraciones de los cromosomas 3 y 8 sobretodo están presentes en los melanomas del cuerpo ciliar donde suelen coexistir. En cambio, las alteraciones del cromosoma 6 se asocian con más frecuencia a melanomas coroideos. Además se ha comprobado como la monosomía del cromosoma 3 y duplicación del 8q se asocian a una reducción considerable de la supervivencia (Singh, Shields y col. 2001).

f. Lesiones predisponentes

Las melanosis congénitas ocular y oculodérmica y los nevus coroideos se consideran entidades con riesgo de desarrollar un melanoma de úvea.

La *melanocitosis ocular o melanosis oculi* y la *melanocitosis oculodérmica (Nevus de OTA)* son dos condiciones genéticas que implican un fallo en la migración de los melanocitos. Estos quedan atrapados durante la vida embrionaria en cualquiera de los tejidos que separan la cresta neural del epitelio superficial. Mientras que en la primera forma clínica la melanosis afecta sobretodo la esclera y epiesclera, en la segunda existe un acúmulo de melanocitos a nivel de la dermis periocular. Ambas entidades se consideran precursoras de melanomas en cualquiera los tejidos afectados (Theunissen, Spincemaille y col. 1993; Patel, Egan y col. 1998; Lopez-Caballero, Saornil-Alvarez y col. 2003). Entre ellos, el melanoma de úvea es el más frecuente (Velazquez y Jones 1983). En estos pacientes, el melanoma uveal crece de forma ipsilateral del lado de la melanosis, en el ojo más pigmentado en casos de melanosis bilaterales y en el área afecta en las melanosis sectoriales. Además la incidencia de melanomas bilaterales o múltiples está incrementada (Singh, De Potter y col. 1998). Aunque las melanosis congénitas son más frecuentes en negros y asiáticos, su asociación con el melanoma de úvea es más común en pacientes blancos (Gonder, Shields y col. 1982; Velazquez y Jones 1983).

A pesar de que *los nevus coroideos* son frecuentes entre la población general (3-6%) y son el origen de la mayoría de los melanomas, su riesgo de transformación maligna siempre se ha considerado muy bajo (1 de cada 10000) (Hale, Allen y col. 1965; Ganley y Comstock 1973). Un estudio reciente de Harbour muestra como la prevalencia de nevus coroideos es mayor que la estimada hasta la fecha (17%) y concluye que la proporción de nevus que van a transformarse en melanoma es todavía menor (Harbour 2004).

### **1.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Los melanomas intraoculares son tumores sólidos cuyas características clínicas varían en función de su tamaño, localización y afectación de las estructuras intraoculares. Su grado de pigmentación es variable, incluso dentro del mismo tumor, abarcando desde el marrón oscuro hasta la amelanosis completa. Pueden adoptar distintas formas y en raras ocasiones, serán bilaterales o multifocales (Shammas y Watzke 1977; Dithmar, Volcker y col. 1999).

Según las series, entre un 55% y 85% de los pacientes con melanoma de úvea presentan síntomas oculares en el momento del diagnóstico (Damato 2001; Eskelin y Kivela 2002). Las alteraciones visuales son la forma de presentación más común. Entre ellas destacan la aparición de visión borrosa, las fotopsias y la reducción del campo visual (Damato 2001). Como media un paciente tarda entre 2 y 3 meses en consultar al especialista desde el inicio de los síntomas (Eskelin y Kivela 2002).

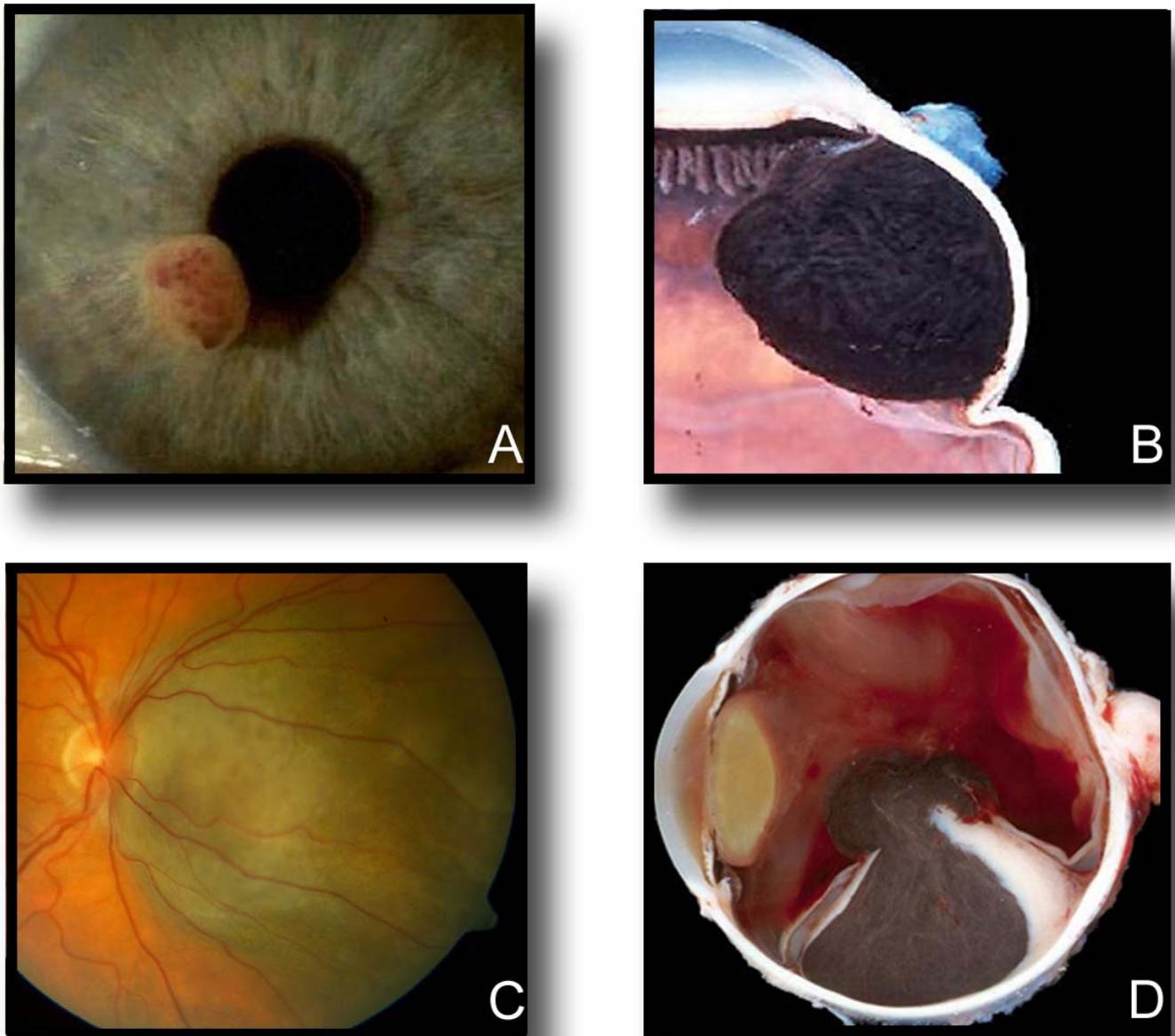
En su extensión, el melanoma también puede manifestarse con dolor, en general producido por la aparición de glaucomas secundarios generados por varios mecanismos. Estos incluyen el desplazamiento anterior del diafragma iris-cristalino por el efecto masa posterior, el bloqueo pupilar por la aparición de sinequias posteriores o el cierre del ángulo camerular debido a la formación de sinequias anteriores o a la neovascularización producida por la necrosis isquémica del tumor e hipoxia retiniana (Escalona-Benz, Benz y col. 2003).

El *melanoma de coroides* suele manifestarse como una masa marronácea, subretiniana y sobreelevada que adopta la típica configuración en “champiñón” cuando logra romper la membrana de Bruch (Figura 1). En la superficie del melanoma se puede observar pequeños acúmulos de pigmento naranja (lipofucsina) a nivel del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y/o la presencia de un desprendimiento seroso de la retina sensorial. Pueden haber hemorragias subretinianas, y la aparición de miodesopsias hará sospechar una hemorragia vítrea en los casos de ruptura de la membrana de Bruch. Hasta un 40% de los tumores alcanza en su crecimiento los 3 mm que rodean el nervio óptico o la fovea produciendo entonces una importante pérdida de la agudeza visual (Damato

2004). Si el tumor afecta la retina suprayacente aparecerán las fotopsias o un defecto en el campo visual.

Los *melanomas del cuerpo ciliar* pueden pasar desapercibidos durante un largo periodo de tiempo debido a su localización. El cuerpo ciliar es una estructura ocular periférica, escondida detrás de la base del iris, donde los melanomas pueden crecer sustancialmente antes de ser detectados. El tumor aparece como una masa pigmentada redonda u ovoide situada inmediatamente detrás de la periferia del cristalino (Figura 1). Algunas características clínicas son de gran ayuda ante la sospecha de un melanoma de cuerpo ciliar. Entre ellas destacar la presencia de un vaso epiescleral centinela en el cuadrante del tumor, una catarata sectorial, una subluxación del cristalino, unas manchas pigmentadas en la esclera o una pigmentación anormal de la raíz iridiana. Estos tumores pueden crecer hacia el polo anterior, invadir la coroides periférica o extenderse de forma extraescleral dando lugar a una masa epiescleral oscura e inmóvil (Simpson 2004). Existe una variedad llamada *melanoma en anillo* en la que el melanoma crece circunferencialmente siguiendo al cuerpo ciliar.

Los *melanomas de iris* se clasifican en tumores circunscritos y difusos. Los melanomas de iris circunscritos son tumores bien delimitados mientras que los difusos poseen un patrón de crecimiento infiltrativo, mal definido y con un componente multifocal confluyente importante (Shields 1999) (Figura 1). Los signos clínicos que harán sospechar malignidad son una vascularización prominente, un ectropion iridiano importante, una catarata sectorial, la extensión extraescleral, el tamaño y un crecimiento progresivo de la lesión. La imagen clínica característica del melanoma de iris difuso es una heterocromía hipercromática iridiana adquirida y un glaucoma secundario ipsilateral que llevará a confusión y será el responsable del retraso en el diagnóstico en un gran número de casos.



**Figura 1:** *Melanoma de úvea. (A) Aspecto clínico del melanoma de iris. (B) Aspecto macroscópico del melanoma del cuerpo ciliar. (C) Aspecto clínico del melanoma de coroides. (D) Aspecto macroscópico del melanoma de coroides.*

### **1.1.4 DIAGNÓSTICO**

La detección del melanoma de úvea ha mejorado sustancialmente gracias al uso de la oftalmoscopia indirecta y las cámaras no midriáticas. Aún así, un estudio realizado por Damato muestra como en un 21% de los pacientes sintomáticos no se detecta el tumor durante la primera visita oftalmológica (Damato 2001).

El error diagnóstico también se ha reducido considerablemente desde la década de los 70 donde el 20% de los ojos enucleados por sospecha clínica de melanoma de úvea no tenían el tumor. Según los resultados publicados del Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS), actualmente el fallo diagnóstico se produce en menos del 1% de los pacientes (COMS 1990). Aunque este porcentaje debe considerarse optimista teniendo en cuenta que en el estudio se descartaron los melanomas uveales atípicos.

La mayoría de los melanomas de úvea, ya sean sintomáticos como asintomáticos, son detectados mediante un *examen del fondo de ojo*. La oftalmoscopia indirecta binocular gracias a que aporta una visión panorámica y estereoscópica del fondo de ojo se ha convertido en la principal arma diagnóstica de los melanomas uveales. Permite detectarlos, hacer una estimación del tamaño basal y apical, valorar el grado de pigmentación y la afectación del resto de estructuras intraoculares.

Las *fotografías en color* permiten documentar la apariencia clínica del melanoma uveal y facilitan el seguimiento de los pacientes con lesiones indeterminadas, pero son de poca ayuda en los tumores periféricos o que afectan al cuerpo ciliar.

La *ecografía ocular* es el examen complementario más importante en el diagnóstico y seguimiento del melanoma de coroides y cuerpo ciliar. Es una técnica no invasiva que permite realizar el cálculo de las dimensiones tumorales con mayor precisión por lo que se utiliza en la valoración del tratamiento y documentación de cualquier crecimiento o regresión. Es de gran utilidad para detectar tumores posteriores en ojos con medios opacos (catarata, hemorragia vítrea) y extensiones extraescleras. Además ayuda a descartar diagnósticos diferenciales e incluso aporta datos pronósticos de la enfermedad

(Coleman, Silverman y col. 2004). En el melanoma uveal, la *ecografía en modo A* se caracteriza por una elevada amplitud inicial de los ecos producida por la retina que se encuentra en el ápex tumoral, seguida de una cadena de ecos de intensidad decreciente debida a la baja reflectividad interna tumoral. Dicho fenómeno se conoce como ángulo Kappa y permite hacer el diagnóstico diferencial con otros tumores intraoculares. En la *ecografía en modo B* la imagen típica consiste en una masa tumoral con una estructura interna regular y una reflectividad media-baja que características de su gran homogeneidad histológica y alta celularidad tisular. Además es frecuente la presencia de una excavación coroidea, reflejo de la penetración del tumor en la coroides normal, y de una sombra orbitaria por la disminución de los ecos en la región que se encuentra detrás del tumor (Mascaró 1987).

La *angiografía fluoresceínica* no puede considerarse una prueba diagnóstica definitiva en el melanoma de úvea puesto que muestra diferentes patrones, ninguno de ellos patognomónico. Aporta información sobre la vascularización, grado de alteración del EPR y ayuda en el diagnóstico diferencial con otras entidades.

La *transiluminación* es una prueba sencilla que puede realizarse en la consulta clínica. Se basa en el bloqueo de la transmisión lumínica que ejerce el pigmento intrínseco de los melanomas uveales. La sombra del tumor se hace visible al colocar una fuente de luz sobre el cuadrante contrario a la lesión en un ojo anestesiado. De esta manera se puede determinar el diámetro basal de los tumores coroides anteriores y del cuerpo ciliar además de conocer el grado de pigmentación tumoral. Es una técnica poco efectiva en los melanomas amelanóticos.

*Tomografía computerizada (TAC)* y *Resonancia Magnética Nuclear (RMN)* son procedimientos diagnósticos complementarios útiles en la delineación del tumor en ojos con medios opacos y en la valoración de su extensión extraescleral y orbitaria (Augsburger, Peyster y col. 1987; De Potter, Flanders y col. 1993).

La *biopsia-aspiración con aguja fina* tiene una indicación muy discutida a la hora de realizar el diagnóstico diferencial con otros tumores intraoculares cuando se han

agotado los métodos no agresivos y decidir el tratamiento en aquellos casos atípicos (Char, Miller y col. 1989).

Y por último, es importante la *caracterización inmunofenotípica* de los melanomas de la úvea que han requerido cirugía para su confirmación histopatológica. Para ello se han empleado anticuerpos monoclonales contra la proteína S-100, el antígeno melánico HMB-45, la vimentina y la enolasa neuronal específica (ENE) (Burnier, McLean y col. 1991).

### **1.1.5 METÁSTASIS EN MELANOMA MALIGNO DE ÚVEA**

A pesar de los buenos resultados del tratamiento local y los avances en el diagnóstico del melanoma maligno de úvea, la aparición de metástasis sigue siendo la principal causa de muerte de estos pacientes. Como ya se ha comentado aproximadamente un 40% de los pacientes van a desarrollar metástasis macroscópicas en los 10 primeros años tras el diagnóstico independientemente del éxito del tratamiento local.

Las metástasis del melanoma maligno de úvea se producen por vía hemática exclusivamente debido a la ausencia de linfáticos intraoculares. Últimamente se ha sugerido que las células circulantes malignas (CCM) con potencial metastásico del tumor primario abandonan el ojo en estadios muy tempranos de la enfermedad, antes del tratamiento e incluso antes de realizar el diagnóstico (Eskelin, Pyrhonen y col. 2000). Apoyando esta teoría, un estudio reciente de nuestro laboratorio todavía no publicado ha logrado aislar CCM en la sangre periférica de casi la totalidad de los pacientes que participaron en él y que clínicamente no presentaban metástasis. Estos resultados sugieren la presencia de micrometástasis “durmientes” en alguna(s) localización(es) del organismo, responsables de la liberación de CCM al sistema circulatorio incluso años después de una enucleación.

Las localizaciones más frecuentes de las metástasis del melanoma maligno de úvea son el hígado (56-90%), pulmón (31%), hueso (7-23%) y piel (17-36,5%) (Missotten y Keunen 2004). También se han descrito focos metastásicos en el corazón (Makitie y

Kivela 2001), mama (Demirci, Shields y col. 2001), cerebro (Midena, de Belvis y col. 1999), coroides contralateral (Singh, Shields y col. 2001) y nódulos linfáticos regionales (Dithmar, Diaz y col. 2000).

El hígado es el órgano más frecuentemente envuelto en la diseminación metastásica del melanoma maligno de úvea. En el momento del diagnóstico de metástasis, hasta un 60% de los pacientes tienen afectación hepática y ad mortem esta cifra alcanza el 90-100% de los casos (Lorigan, Wallace y col. 1991). Un 30% de los pacientes únicamente presentarán metástasis hepáticas. Su aparición se asocia con una reducción significativa de la esperanza de vida. Si el hígado es el primer órgano afectado en el proceso metastásico la supervivencia media de los pacientes es de 5 a 7 meses, mientras que si la localización inicial de las metástasis es extrahepática la supervivencia se alarga hasta los 18 meses (Rajpal, Moore y col. 1983; Bedikian, Legha y col. 1995).

Actualmente los principales objetivos en el seguimiento de estos pacientes son la detección precoz de metástasis e identificación de los principales factores de mal pronósticos clínicos e histológicos como la localización, tamaño tumoral y tipo celular (descritos previamente). Para lograr el primer objetivo, todos los pacientes con melanoma maligno de úvea son sometidos a un screening inicial y unos controles periódicos cada 6 meses (Hicks, Foss y col. 1998; Eskelin, Pyrhonen y col. 1999). Estos estudios incluyen la realización de una evaluación sistémica general, radiografía de tórax, ecografía hepática y pruebas de función hepática (Lactato deshidrogenasa (LDH), gamma-Glutamil Transpeptidasa (gamma-GT) y Fosfatasa alcalina (FA)). En el caso de obtener resultados con alta sospecha de metástasis se solicitarán pruebas adicionales como un escáner abdominal y una biopsia-aspiración con aguja fina.

Las posibilidades terapéuticas de los pacientes con metástasis son varias aunque sus resultados son poco alentadores. Los mayores avances terapéuticos se han realizado en el tratamiento de los focos metastásicos hepáticos aislados. Para ellos se están realizando quimioembolizaciones hepáticas, quimioterapia arterial intrahepática y perfusión aislada hepática. En cuanto a la quimioterapia sistémica con o sin cirugía ha demostrado ser más efectiva en pacientes con metástasis extrahepáticas y la

quimioterapia asociada a inmunoterapia ha obtenido resultados modestos (Missotten y Keunen 2004).

### **1.1.6 FACTORES PRONÓSTICOS**

En los últimos años, se han identificado una serie de factores tumorales que están directamente relacionados con la aparición de metástasis y por lo tanto con un peor pronóstico de los enfermos. De todos ellos, los dos más importantes para predecir la supervivencia son el tamaño tumoral y el tipo de célula que constituye el tumor.

#### a. Factores pronósticos clínicos

##### Localización

La mortalidad de los melanomas de iris es baja (3-5%) a los 10 años debido, en general, al diagnóstico precoz cuando todavía son tumores pequeños y a que histológicamente suelen estar compuestos por un tipo celular poco maligno (Davidorf 1981; Shields, Shields y col. 2001). Los principales factores de riesgo clínicos metastáticos en el melanoma de iris incluyen la edad, el aumento de la presión intraocular, la extensión hacia el ángulo camerular y la extensión extraexcleral (Shields, Shields y col. 2001).

Los melanomas del cuerpo ciliar y coroides tienen peor pronóstico. La mortalidad de los pacientes con melanoma de cuerpo ciliar es del 22% a los 5 años del tratamiento con radioterapia (Gunduz, Shields y col. 1999) y el tiempo medio de aparición de las metástasis es 68 meses.

##### Tamaño

El tamaño tumoral es uno de los factores pronósticos más importantes de la evolución del paciente. En función del diámetro basal tumoral (DBT) y la altura, los melanomas de coroides se clasifican en pequeños (<10 mm DBT y < 3mm altura), medianos (10-15 mm DBT y 3-8 mm altura) y grandes (>15 mm DBT y >8mm altura). Se estima que la

mortalidad a los 5 años es respectivamente de 16%, 32% y 53% (Diener-West, Hawkins y col. 1992).

#### Patrón de crecimiento

Aunque la mayoría de los melanomas de úvea presentan un patrón de crecimiento nodular, existen casos poco comunes denominados difusos donde la neoplasia crece infiltrando la coroides sin producir protusión. Los melanomas de úvea nodulares tienen un mejor pronóstico que los difusos cuya mortalidad alcanza el 24% de los casos a los 5 años (Shields, Shields y col. 1996). Este porcentaje se debe a que los tumores de úvea difusos suelen diagnosticarse tardíamente, poseen un elevado número de células epitelioides y tendencia a invadir estructuras extraoculares.

La presencia de una ruptura en la membrana de Bruch no se considera un factor pronóstico (Seddon, Albert y col. 1983).

#### Extensión extraescleral

La presencia de una extensión extraescleral ensombrece el pronóstico de la enfermedad.

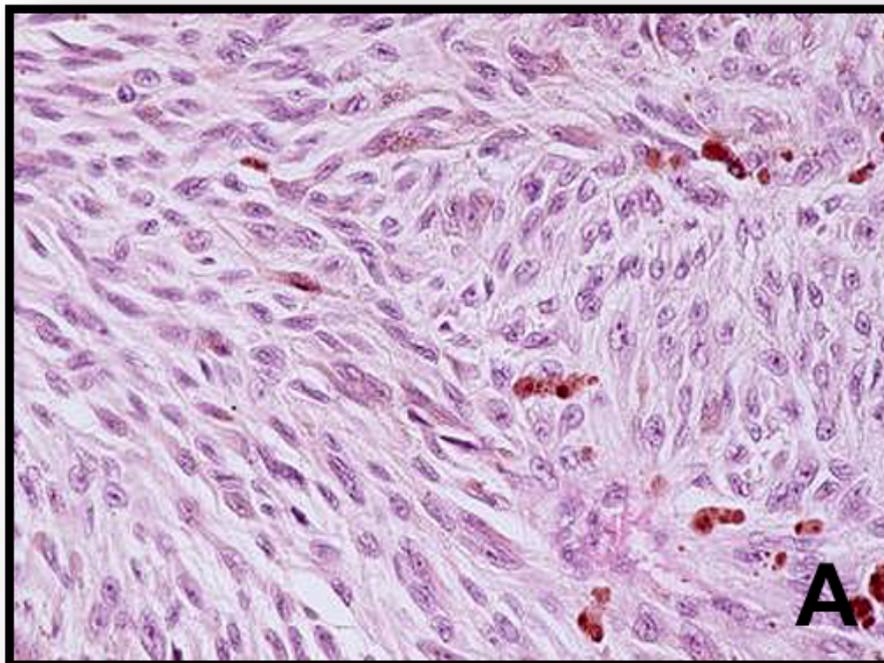
### b. Factores pronósticos histopatológicos

#### Tipo celular

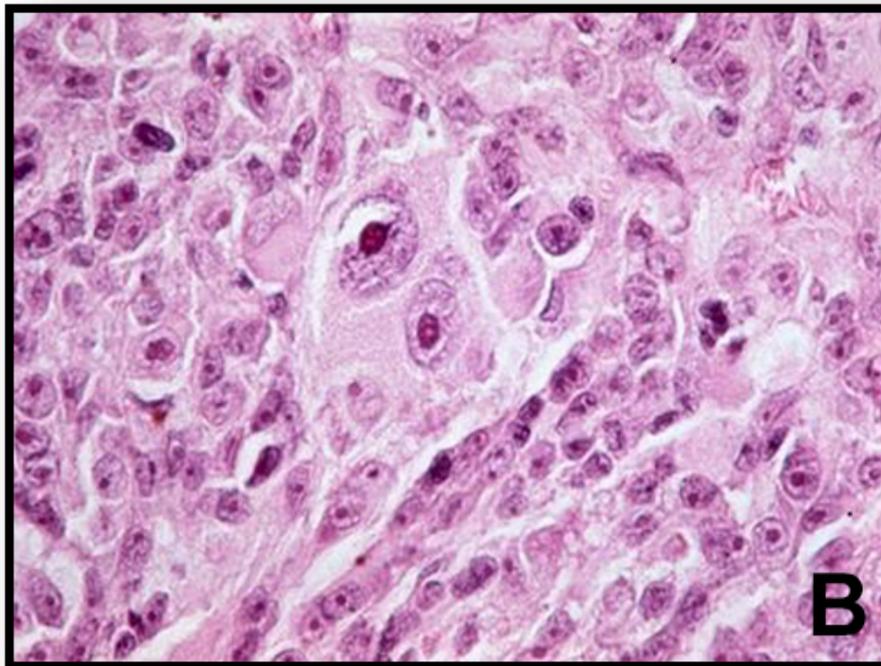
En 1931 Callender propuso un sistema de clasificación para el melanoma uveal basado en el tipo celular (Callender 1931). Esta clasificación fue modificada en 1983 por McLean y asociados que introdujeron una correlación entre el tipo celular y la mortalidad en el melanoma de úvea (McLean, Foster y col. 1983).

Los melanomas de úvea poseen dos tipos de células tumorales: las células fusiformes y las células epitelioides (Figura 2). Las células fusiformes de tipo A se caracterizan por ser células alargadas en forma de huso, sin nucleolo o figuras mitóticas visibles, con un

ratio núcleo/citoplasma bajo, la presencia de un pliegue longitudinal a nivel de la membrana nuclear y una tendencia a la cohesividad. En la nueva clasificación, los tumores melanocíticos benignos o nevus están compuestos exclusivamente por células fusiformes de tipo A. Las células fusiformes de tipo B son también células en forma de huso muy cohesivas pero con un nucleolo bien diferenciado, un ratio núcleo/citoplasma elevado y alguna figura mitótica. Se denominan melanomas de úvea fusiformes los tumores compuestos por células fusiformes de tipo A y B. Estos melanomas son los de mejor pronóstico. Las células epitelioides se diferencian por ser células grandes, con abundante citoplasma eosinófilo, gran pleoformismo, falta de cohesividad entre ellas y la presencia de uno o varios nucleolos prominentes. El número de mitosis es variable pero siempre mayor que en las fusiformes. Los melanomas compuestos únicamente por células epitelioides son muy infrecuentes y corresponden a los de peor pronóstico. Los melanomas mixtos están compuestos por células fusiformes y epitelioides. Representan el 52% de todos los melanomas de úvea. Su pronóstico intermedio variará en función de la proporción de células epitelioides que lo formen (McLean, Foster y col. 1982).



**Figura 2A:** Aspectos microscópicos del melanoma de úvea. Células fusiformes (H&E, magnificación original 400x).



**Figura 2B:** Aspectos microscópicos del melanoma de úvea. Células epitelioides (H&E, magnificación original 400x).

### Actividad mitótica

La actividad mitótica se mide contando el número de mitosis que aparecen en 40 campos de gran aumento (CGA). A mayor número de mitosis, peor pronóstico. Los tumores con una baja actividad mitótica (0-1 por CGA) tienen una mortalidad del 15% a los 6 años, mientras que la mortalidad de los tumores con elevada actividad mitótica (9-48 por CGA) es del 56% (McLean, Foster y col. 1977).

### Patrones vasculares

Debido a la ausencia de un sistema linfático intraocular, los melanomas malignos de úvea únicamente pueden metastatizar por vía sanguínea. Es por ello que la presencia de patrones vasculares en el tumor ha despertado un enorme interés entre los

investigadores. Folberg y col. fueron los primeros en documentar la existencia de distintos patrones microvasculares en los melanoma de úvea (Folberg, Pe'er y col. 1992). Desde entonces, su histogénesis, naturaleza y función son motivo de estudio y controversia entre los investigadores (Kivela, Makitie y col. 2004). Aparecen como canales tridimensionales de aspecto vascular, que transportan plasma y a veces sangre, pero que no están delimitados por células endoteliales sino por componentes de la membrana basal. Son estructuras compuestas básicamente por matriz extravascular (Folberg, Hendrix y col. 2000). Varios estudios *in vitro* han demostrado como las propias células del melanoma de úvea son las responsables de estimular la formación de estos canales a través de los cuales se ha logrado inyectar diversas sustancias de contraste (Maniotis, Folberg y col. 1999; Maniotis, Chen y col. 2002). Para su identificación se han usado varias técnicas (fluoresceína conjugada Ulex europeaeus agglutinin I, tinción azan). La más utilizada es la tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) que reacciona con las membranas basales periendotheliales. A nivel clínico es posible reconocer algunos de los patrones usando una angiografía confocal con verde de indocianina (Mueller, Bartsch y col. 1998).

Hay descritos 9 patrones microvasculares diferentes, unos lineales y otros circulares, algunos de ellos pertenecen a nevus (Rummelt, Folberg y col. 1994) o melanomas uveales de bajo grado, mientras que otros se consideran importantes predictores del riesgo de metástasis (Folberg, Rummelt y col. 1993; Rummelt, Folberg y col. 1995). Entre estos últimos cabe destacar los círculos y redes microvasculares puesto que son, a parte de los más ampliamente estudiados, los que se han asociado a un mayor riesgo de muerte por metástasis (Folberg, Rummelt y col. 1993; Foss, Alexander y col. 1997).

Una de las hipótesis que ha suscitado gran interés a la hora de explicar la presencia de estos patrones de microvascularización asociados a un peor pronóstico es que funcionan como alternativa a la clásica angiogénesis favoreciendo el crecimiento tumoral y la siembra metastásica, que en el caso del melanoma de úvea sólo puede producirse por vía hemática (Kivela, Makitie y col. 2004).

Dentro de un mismo tumor es frecuente encontrar una heterogenicidad en el tipo y distribución de patrones vasculares, intercalándose áreas de relativo “silencio vascular” con áreas donde abundan dichas formaciones (Folberg, Rummelt y col. 1993).

Siguiendo la definición original de Folberg y col 4, un círculo vascular cerrado (CVC) es un patrón microvascular curvado y completamente cerrado que engloba a un grupo

de células tumorales. La presencia de un sólo CVC en un melanoma de úvea es suficiente para clasificarlo en este grupo. Se consideran redes microvasculares el contacto de al menos tres CVC. Por definición, si las redes están presentes, los CVC también. Son estructuras que pueden variar considerablemente de tamaño y forma de un tumor a otro y entre distintas áreas de un mismo tumor. Ambos patrones son los más ampliamente relacionados con una baja supervivencia de los pacientes y se consideran marcadores de mal pronóstico en el melanoma maligno de úvea, y en particular en el melanoma de coroides. El porcentaje de melanomas malignos de úvea que presentan CVC varía según las series publicadas desde un 8 a un 65% (Kivela, Makitie y col. 2004). Han sido varios los estudios que han demostrado que la presencia de CVC y redes microvasculares aumentan en más de un 35% la mortalidad por metástasis (Folberg, Rummelt y col. 1993; McLean, Keefe y col. 1997; Kivela, Makitie y col. 2004). También se ha comprobado como los focos metastáticos presentan una mayor proporción de círculos y redes microvasculares que los tumores primarios, sugiriendo la importancia del microambiente en el desarrollo de estos patrones microvasculares (Kivela, Makitie y col. 2004).

#### Infiltración linfocítica tumoral (ILT)

Hasta un 5-12% de los melanomas de úvea presentan una invasión linfocitaria, en particular de linfocitos T. Se ha demostrado que, paradójicamente, esta infiltración se asocia con un peor pronóstico por muerte metastásica precoz (Durie, Campbell y col. 1990). Debido a la ausencia de linfáticos en el ojo, la exposición de los linfocitos al antígeno tumoral sólo puede tener lugar a nivel sistema sanguíneo general. Se hipotetiza que debe existir una liberación de células tumorales al torrente circulatorio para que se produzca la activación del sistema inmune frente al melanoma de úvea, hecho que también explicaría el mal pronóstico asociado (de la Cruz, Specht y col. 1990).

### Núcleo y nucleolo

Varios estudios citomorfométricos muestran como la desviación estándar del área nuclear (SDNA) y la media de los diámetros de los 10 más largos nucleolos (MLN) son también criterios de mal pronóstico en la supervivencia de los pacientes con melanoma de úvea (McCurdy, Gamel y col. 1991; Gamel, McCurdy y col. 1992; McLean, Keefe y col. 1997; Seregard, Spangberg y col. 1998).

### **1.1.7 TRATAMIENTO DEL MELANOMA DE ÚVEA**

La observación cautelosa, la enucleación, la braquiterapia episcleral, la termoterapia transpupilar (TTT), la irradiación con partículas cargadas y la resección local de la neoplasia son las principales alternativas que existen actualmente en el manejo del melanoma de úvea. La elección de una u otra va a depender del tamaño, la localización, extensión y crecimiento documentado del tumor, así como de la edad, estado general, expectativa de vida y deseo del paciente por preservar el globo ocular.

En general, se recomienda la *observación periódica* de los tumores pequeños que están en el límite entre un nevus grande y un melanoma incipiente. Solo la tendencia documentada al crecimiento o la presencia de signos de actividad tumoral justificaría la realización de un tratamiento (Caminal Mitjana, Quintana Casany y col. 2002; Shields 2002).

Cuando el tumor es grande y no existe posibilidad alguna de preservar o recuperar visión, la *enucleación* es el tratamiento de elección. La enucleación fue considerada durante años como el único tratamiento del melanoma de úvea posterior. Actualmente, el número de ojos enucleados se ha reducido considerablemente gracias a un mejor conocimiento de la historia natural del tumor, los avances en los métodos diagnóstico y al desarrollo de tratamientos más conservadores.

Cuando el tumor es mediano o existe la posibilidad de conservar cierto grado de visión, la *braquiterapia* suele ser el tratamiento de primera elección. Su objetivo es conseguir

mediante unas placas radioactivas, con isótopos de yodo 125 o rutenio106, una radiación suficiente en el ápex tumoral sin dañar las estructuras sanas del globo ocular.

La *termoterapia transpupilar (TTT)* puede combinarse con la braquiterapia para reducir la exudación, confirmar la esterilización tumoral y prevenir o tratar el edema macular (Damato 2004). Solo en casos muy selectivos se recomienda el uso de la TTT como tratamiento único (Shields, Shields y col. 2002).

La *radioterapia con protones* es una técnica poco expandida debido a que sólo algunos centros poseen la posibilidad de aplicarla. Damato y col. han conseguido resultados muy esperanzadores con pocos efectos secundarios en 100 casos de melanoma de úvea previamente seleccionados (Damato 2004), pero en general es un tratamiento que se asocia a complicaciones oculares postirradiación como el glaucoma neovascular o la formación de una catarata secundaria.

Por último la *escisión quirúrgica* (resección transretinal o endoresección y resección transescleral) del melanoma de úvea se presenta como un tratamiento que requiere de una gran experiencia por parte del cirujano debido a la complejidad de las técnicas quirúrgicas y la dificultad que conlleva la valoración de los márgenes tumorales (García-Arumi, Sararols y col. 2001). Además son cirugías muy controvertidas debido a la posibilidad de siembra de las células tumorales. Bornfeld y col. recomiendan la aplicación de radioterapia estereotáctica previa a la endoresección para minimizar dicho riesgo (Bornfeld, Talies y col. 2002).

En un intento para comparar la eficacia de los diferentes tratamientos en la supervivencia de los pacientes con melanoma de úvea se diseñaron una serie de estudios clínicos, denominados COMS (*Collaborative Ocular Melanoma Study*), en los que participan 42 centros de Norteamérica. Los resultados más relevantes del COMS muestran como la braquiterapia y la enucleación son superiores frente al resto de tratamientos a la hora de reducir la incidencia de metástasis. También se observó como no existen diferencias significativas en la supervivencia global entre los pacientes enucleados y los irradiados (Diener-West, Earle y col. 2001) ni entre los pacientes irradiados pre-enucleación versus los pacientes únicamente enucleados (Earle 1999).

## **1.2 METÁSTASIS**

### **1.2.1 PATOGÉNESIS DE LA METÁSTASIS**

La formación de metástasis es un fenómeno selectivo y muy complejo formado por una serie de etapas secuenciales e interrelacionadas en las que participan tanto las células tumorales como las del propio huésped (Woodhouse, Chuaqui y col. 1997).

El proceso metastásico se inicia con la *mutación genética* de una célula que se escapa al sistema inmune. Dicha célula empieza a *multiplicarse* de forma incontrolada formando el tumor primario. Cuando este excede un milímetro de diámetro, la necesidad de sus células de obtener un aporte sanguíneo suficiente que les permita abastecer sus necesidades metabólicas determina el inicio de la *angiogénesis*. Mediante la síntesis y secreción de factores angiogénicos, el tumor crea una red capilar a partir del tejido sano colindante. Estos neovasos de paredes delgadas apenas ofrecen resistencia a la penetración de las células malignas y representan una vía de escape hacia el sistema sanguíneo circulatorio. Este proceso es conocido como *intravasación*. Las células tumorales también pueden entrar en el sistema sanguíneo circulatorio de forma indirecta a través del sistema linfático. Una vez dentro del vaso, las células pueden iniciar su crecimiento adheridas a la pared vascular o bien, como células tumorales solitarias o formando agregados, se despegan de la pared vascular y circulan libremente como émbolos tumorales por la sangre. Es la etapa de la *embolización*. Un importante número de estas células será destruido rápidamente por el sistema inmune o por las turbulencias de la circulación. Las células que logren sobrevivir acabarán atrapadas en el lecho capilar de un órgano distante, se adherirán a sus células endoteliales o a membrana basal subendotelial y tendrá lugar la *extravasación*. Una vez dentro del parénquima del nuevo órgano, las células que logren evadir el sistema inmune del huésped, pueden permanecer como células solitarias o bien empezar el proceso de *proliferación* creando pequeñas micrometástasis preangiogénicas no detectables clínicamente. A medida que estas aumentan de tamaño y número, irán vascularizándose progresivamente y se harán clínicamente visibles. Las células malignas pueden entonces invadir de nuevo los vasos

sanguíneos, entrar en la circulación y producir metástasis adicionales (Chambers, Naumov y col. 2001).

### **1.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO METASTÁSICO**

El estudio del proceso metastático ha permitido conocer una serie de características que lo definen y son ampliadas a continuación.

#### **a. Potencial metastático**

Una neoplasia se considera biológicamente heterogénea (Fidler 1999). Está compuesta por varios tipos de células tumorales con propiedades diversas. Este hecho explica el porque no todas las células del tumor primario tienen el mismo potencial metastático o lo que es lo mismo, la capacidad de completar todos los pasos de la cascada metastática. Únicamente aquella subpoblación de células que cumpla una serie de requisitos especiales llegará a implantarse en el órgano diana, superando la intravasación y embolización, deteniéndose en un lecho capilar, extravasándose y multiplicándose nuevamente.

#### **b. Especificidad metastática**

Otra de las características del proceso metastático es la especificidad. Se ha demostrado que en la gran mayoría de las células cancerígenas con habilidad metastática poseen un comportamiento no randomizado a la hora de establecerse en un determinado órgano. Existen varias teorías para explicar dicho fenómeno.

Stephen Paget, en 1889, fue el primero en publicar una hipótesis, la teoría del “*seed and soil*”. Paget propuso que la distribución no aleatoria de las células cancerígenas (que denominó “*seed*” o semilla) a través del organismo, su supervivencia selectiva y su proliferación sólo ocurren en aquellos órganos (que denominó “*soil*” o terreno) que presentan las condiciones y los factores de crecimiento adecuados, y por los que las

células tienen una afinidad específica. Paget concluía que las metástasis se desarrollaban únicamente cuando el “*seed and soil*” eran compatibles (Paget 1889).

En 1929, James Ewing desafió la teoría de Paget y propuso que la diseminación metastásica hacia un órgano determinado se producía básicamente por factores mecánicos (Ewing 1928). Defendía que dicha diseminación estaba relacionada con la estructura anatómica del sistema vascular entre el tumor primario y los órganos secundarios. Su hipótesis prevaleció durante décadas hasta que se pudo documentar que, ambas teorías no son excluyentes. Diversos experimentos realizados en ratones de laboratorio muestran que tanto la existencia de factores mecánicos vasculares como la compatibilidad entre las células metastásicas y el microambiente tumoral contribuyen en la especificidad metastásica y determinan la preferencia de las células metastásicas hacia un determinado órgano (Chambers, Groom y col. 2002).

Siguiendo la teoría de Paget, conocer los mecanismos moleculares y celulares responsables de las interacciones entre las células metastásicas y el tejido del órgano secundario se considera una condición necesaria para lograr frenar o invertir el proceso de diseminación. En los últimos años se han llevado a cabo muchas investigaciones a nivel genético y molecular sobre el tema.

Por un lado se ha visto que las células tumorales adquieren la habilidad de completar todos los peldaños de la cascada metastásica gracias a un acúmulo de mutaciones genéticas específicas que se producen progresivamente en el tiempo y dan lugar a un grupo de genes metastáticos conocidos como “*tool-box*”. El perfil genético de la “*tool-box*” marcará la habilidad celular para colonizar órganos específicos. Los avances realizados en el estudio de la firma genética en células malignas circulantes empiezan a dar resultados y permiten distinguir entre las células que metastatizarán en un determinado órgano y las que no lo harán (Kang, Siegel y col. 2003; Minn, Kang y col. 2005).

Por otro lado, se investiga la desregulación en la expresión de determinadas moléculas en el microambiente tumoral del órgano diana y sus consecuencias en la interacción entre las células del huésped y las de la neoplasia. Se ha observado como algunas de

estas moléculas poseen una gran influencia a la hora de permitir o no el crecimiento y proliferación de un foco tumoral secundario. Entre estas últimas cabe destacar las quimiocinas. Como se verá más adelante, las quimiocinas poseen propiedades quimioatrayentes órgano-específicas que explican la especificidad y eficiencia de la migración de las stem cells hematopoyéticas hacia la médula ósea. Recientemente se ha demostrado como también participan en el “homing” o migración específica de las células metastásicas que expresan sus receptores hacia aquellos órganos las producen y secretan (Moore 2001).

### c. Progresión neoplásica

Diversos estudios clínicos y experimentales han demostrado que las células neoplasias están sujetas a una serie de cambios a lo largo del tiempo. Se definió como “progresión neoplásica” a la adquisición de cambios permanentes, irreversibles y cualitativos en una o más características de las células tumorales. Esta evolución es gradual, pudiendo abarcar muchos años, y podría explicar porque el comportamiento del tumor puede variar en los diferentes estadios de la enfermedad.

### d. Insuficiencia metastásica

Evidencias clínicas y experimentales muestran como la formación de metástasis es, afortunadamente, un proceso ineficiente (Weiss 1990). Apenas unas pocas células del tumor primario con potencial metastásico que llegan al torrente sanguíneo van acabar desarrollando metástasis. La gran mayoría de las células con habilidad metastásica nunca llegará a establecerse como un foco tumoral secundario (Tarin, Price y col. 1984; Cameron, Schmidt y col. 2000) debido a que un fallo en la culminación de cualquiera de las etapas detendrá la totalidad del proceso metastásico.

La destrucción de las células cancerígenas en la microcirculación y su inhabilidad en extravasarse fueron consideradas durante mucho tiempo como la mayor causa de ineficiencia metastásica. Estudios experimentales demostraron que en las primeras 24

horas, menos del 0,1% de las células malignas que entran en el sistema sanguíneo circulatorio siguen viables y que menos del 0,01% de estas células logra sobrevivir para formar metástasis (Fidler, 1990). Las teorías apuntan que la mayoría de células son destruidas por el sistema inmune o por factores hemodinámicas (Hanna 1982). La poca habilidad de las células tumorales en extravasarse también se considera un punto ineficiente (Stetler-Stevenson, Aznavoorian y col. 1993).

Pero investigaciones más recientes han demostrado que tanto la diseminación sanguínea como la extravasación de células cancerígenas inyectadas en modelos animales son bastante eficientes (Koop, MacDonald y col. 1995), y que los momentos de mayor insuficiencia metastásica corresponden a la etapa post-extravasación, cuando solo un pequeño porcentaje de células inicia su división para formar micrometástasis y donde un también pequeño número de estas micrometástasis persistirá, crecerá y se vascularizará formando metástasis clínicamente visibles (Chambers, MacDonald y col. 1995; Koop, MacDonald y col. 1995; Luzzi, MacDonald y col. 1998).

#### e. Estado durmiente

Las metástasis pueden aparecer años después de tratar con éxito el tumor primario, como es el caso del melanoma de coroides. Para explicar este fenómeno se introdujo el término de “estado durmiente”(Hadfield 1954; Wheelock, Weinhold y col. 1981) que engloba diferentes conceptos. Por un lado, varios estudios documentan como una célula solitaria, que ha logrado superar la extravasación, falla en el inicio de su división celular y puede persistir durante un largo periodo de tiempo en el parénquima del órgano secundario sin proliferar ni entrar en apoptosis. Dichas células además de contribuir al estado durmiente del tumor, no son susceptibles a las terapias que actúan directamente en la multiplicación de las células tumorales (Cameron, Schmidt y col. 2000; Naumov, MacDonald y col. 2002).

Otro aspecto es el de las micrometástasis preangiogénicas durmientes. Estas se caracterizan por la existencia de un balance entre una proliferación y una apoptosis activas de sus células, debido a la falta de vascularización, y que tiene como resultado el

no crecimiento del tumor secundario. Si se activa la angiogénesis, cesa el estado durmiente y la metástasis empieza a crecer (Folkman 1992; Holmgren, O'Reilly y col. 1995).

### **1.3 QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS**

#### **1.3.1 GENERALIDADES**

##### **a. Quimiocinas**

Su nombre procede de “citocinas quimiotácticas” debido a que muchas de estas moléculas poseen propiedades quimioatrayentes que les permiten regular el tráfico celular hacia determinados órganos y tejidos.

##### **(i) Clasificación**

Las quimiocinas son una gran superfamilia de pequeños polipéptidos caracterizadas bioquímicamente por la conservación de 4 residuos de cisteína que se unen formando puentes disulfuro imprescindibles para la actividad de la molécula. Se subclassifican en cuatro grupos según la localización de los dos primeros residuos de cisteína NH<sub>2</sub>-terminal en la proteína madura: CXC o alpha, CC o beta, C o gamma y CX<sub>3</sub>C o delta. A día de hoy han sido identificadas aproximadamente 50 quimiocinas y 18 de sus receptores (Murphy, Baggiolini y col. 2000) (Tabla 1).

		Nueva Nomenclatura	Antigua Nomenclatura	Localización Cromosómica	Receptor
CXC QUIMIOCINAS	ELR	CXCL1	Gro/MGSA-a	4q12-13	CXCR2
		CXCL2	Gro/MGSA-b	4q12-13	CXCR2
		CXCL3	Gro/MGSA-g	4q12-13	CXCR2
		CXCL5	ENA-78	4q12-13	CXCR2
		CXCL6	GCP-2	4q12-13	CXCR1, CXCR2
		CXCL7	NAP-2	4q12-13	CXCR2
		CXCL8	IL-8	4q12-13	CXCR1, CXCR2
	No ELR	CXCL4	PF-4	4q12-13	DESCONOCIDO
		CXCL9	Mig	4q21.21	CXCR3
		CXCL10	IP-10	4q21.21	CXCR3
		CXCL11	I-TAC	4q21.21	CXCR3
		CXCL12	SDF1-alpha	10q11.1	CXCR4
		CXCL13	BCL/BCA-1	4q21	CXCR5
		CXCL14	Brak/Bolequine	5q31	DESCONOCIDO
CC Quimiocinas	CCL1	I-309	17q11.2	CCR8	
	CCL2	MCP-1/MCAF	17q11.2	CCR2	
	CCL3	MIP-1alpha/LD78alpha	17q11.2	CCR1, CCR5	
	CCL4	MIP-1	17q11.2	CCR5	
	CCL5	RANTES	17q11.2	CCR1, CCR3, CCR5	
	CCL7	MCP-3	17q11.2	CCR1, CCR2, CCR3	
	CCL8	MCP-2	17q11.2	CCR3	
	CCL11	Eotaxina-3	17q11.2	CCR3	
	CCL13	MPC-4	17q11.2	CCR2, CCR3	
	CCL14	HCC-1	17q11.2	CCR1	
	CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1gamma	17q11.2	CCR1, CCR3, CCR5	
	CCL16	HCC-4/LEC	17q11.2	CCR1	
	CCL17	TARC	16q13	CCR4	
	CCL18	DC-CK1/PARK AMAC-1	17q11.2	DESCONOCIDO	
	CCL19	MIP-3alpha/ELC/Exodus-3	9p13	CCR7	
	CCL20	MIP-3alpha/ELC/Exodus-1	2q33-37	CCR6	
	CCL21	6Cquina/SLC/Exodus-2	9p13	CCR7	
	CCL22	MDC/STCP-1	16q13	CCR4	
	CCL23	MPIF-1	17q11.2	CCR1	
	CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	7q11.23	CCR3	
	CCL25	TECK	19p13.2	CCR9	
	CCL26	Eotaxina-3	7q11.23	CCR3	
	CCL27	CTACK/ILC	9p13	CCR10	
	CCL28	MEC	5	CCR3, CCR10	
	C Quimiocinas	XCL1	Linfotactina/SCM-1 alpha/ATAC	1q23	XCR1
		XCL2	SCM-1	1q23	XCR1
	CX3C Quimiocinas	CX3CL1	Factaluina	16q13	CX3CR1

**Tabla 1 :** Quimiocinas CXC, CC, C, CX3C y sus receptores. Nomenclatura actual, antigua, localización cromosómica de los genes codificantes para cada una de ellas y sus receptores.

La casi totalidad de las quimiocinas conocidas en humanos pertenecen a los grupos CXC y CC cuya información genética, salvo excepciones, se encuentra distribuida en el genoma de los cromosomas 4 y 17. La principal diferencia bioquímica entre ambos grupos es la presencia o no de un aminoácido entre las dos primeras cisteínas (cis-X-cis versus cis-cis). Dentro de las quimiocinas con estructura molecular CXC existe una subclasificación que divide a las *quimiocinas inflamatorias* clásicas con capacidad atrayente sobre los monocitos y neutrófilos y las *inmunoquimiocinas* que actúan sobre los linfocitos. Estas diferencias se atribuyen a que las primeras poseen la secuencia de aminoácidos ELR (ácido glutámico-leucina-arginina) antes que el primer residuo de cisteína mientras que las inmunoquimiocinas no poseen dicho dominio (CXC-no ELR). Las quimiocinas CC han demostrado ser quimioatrayentes para monocitos, linfocitos, células dendríticas, natural killer, eosinófilos y basófilos.

En la familia de las quimiocinas C, la única molécula caracterizada hasta la fecha es la linfotactina de la cual se distinguen dos formas: XCL1 y XCL2. Su información genética se ubica en el cromosoma 1 y actúa como quimioatrayente para los linfocitos. La linfotactina es la única quimiocina que posee dos residuos de cisteína en vez de cuatro.

Por último existe la quimiocina CX3C que presenta 3 aminoácidos entre los dos residuos de cisteína del extremo N-terminal. La fractalkina es la única molécula identificada perteneciente a este grupo, se codifica en el cromosoma 16 y ha sido implicada en la adhesión de las células T con los monocitos.

#### (ii) Fuentes celulares

Existe una amplia diversidad de células que sintetizan y secretan quimiocinas. Los leucocitos, células tumorales, macrófagos, monocitos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, células del músculo liso, hepatocitos y astrocitos son ejemplo de ello. La producción de un determinado tipo de quimiocina dependerá de las condiciones particulares de cada microambiente y está sujeta a cambios temporales y espaciales. En general, su expresión suele producirse como respuesta a un número importante de

estímulos (factores inflamatorios crónicos y agudos, irritantes, antígenos y citoquinas) pero también existen tejidos que la producen de forma constitucional.

(iii) Efectos biológicos

Gracias al gran avance que se está llevando a cabo en la investigación de estas moléculas cada vez son más conocidos los efectos biológicos de la interacción quimiocina-receptor de quimiocina en el cuerpo humano. A continuación citaremos algunos de los más importantes, muchos de los cuales serán desarrollados con más detalle en el transcurso de la revisión bibliográfica. Las quimiocinas juegan un papel crítico en la migración, adhesión, proliferación y apoptosis celular, morfogénesis tisular, modulación de la hematopoyesis, desarrollo de respuestas inmunes, regulación de la angiogénesis, exocitosis de gránulos, transcripción de genes y síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno (Rossi y Zlotnik 2000; Gerard y Rollins 2001; Moser y Ebert 2003).

b. Receptores de quimiocinas

Las quimiocinas ejercen su función mediante su interacción con receptores celulares. Los receptores de quimiocinas, al igual que los de la rodopsina, poseen un extremo aminoterminal (N-terminal) extracelular, siete dominios transmembrana orientados de forma perpendicular a la membrana plásmática, con 3 loops extracelulares y 3 intracelulares y acoplados a la proteína G en su extremo carboxiterminal (C-terminal) intracelular. Las partes extracelulares del receptor participan en la unión de las quimiocinas mientras que las partes intracelulares están implicadas en el envío y transducción de señales al interior de la célula de las que derivan las acciones celulares.

En la interacción quimiocina-receptor es importante recalcar que una misma quimiocina puede unirse de forma específica con diferentes receptores y que un mismo receptor puede poseer selectividad y afinidad por varias quimiocinas. Algunos receptores van a transducir señales diferentes y específicas para cada uno de sus ligandos dependiendo del tipo de célula que los expresan y del momento en que sean expresados (Gerard y

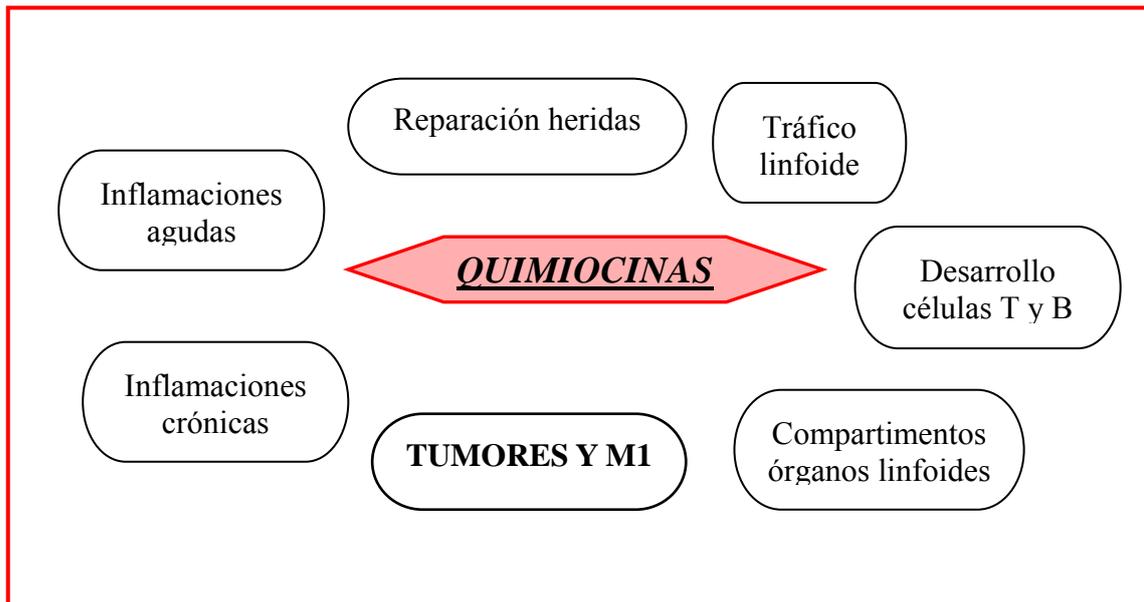
Rollins 2001). También encontramos quimiocinas que son altamente selectivas para un único receptor y receptores que sólo interaccionan con un tipo de quimiocinas, como es el caso de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4.

La nomenclatura de los receptores de quimiocinas también está consensuada. Se nombran como CXC, CC, C y CX3C acompañados de una R (que indica que es el receptor para una quimiocina de esa familia) y de un número (que identifica al receptor en cuestión). Ver tabla 1.

Los receptores de quimiocinas pueden estar expresados en la superficie celular constitucionalmente o ser inducidos. Se han identificado una gran variedad de células del organismo humano que expresan receptores de quimiocinas y constituyen sus “células blanco”. Estas incluyen las células hematopoyéticas, células de la respuesta inmune, endoteliales, del músculo liso, timocitos, keratinocitos, neuronas y células tumorales (Rollins 1997). Algunos de los receptores de quimiocinas despertaron un gran interés al actuar como co-receptores para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Seibert y Sakmar 2004).

### **1.3.2 FUNCIONES DE LAS CXC QUIMIOCINAS EN HUMANOS**

Las quimiocinas CXC están implicadas en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Figura 3). Es importante distinguir que mientras que muchas quimiocinas muestran un patrón de expresión que juega un importante papel en condiciones inflamatorias, otras presentan un perfil claramente hemostático, existiendo también un grupo con ambas características (Rottman 1999; Rossi y Zlotnik 2000; Gerard y Rollins 2001)



**Figura 3 :** Implicación de las quimiocinas en los procesos fisiológicos y patológicos

Una de las funciones más conocidas de las quimiocinas es su participación en situaciones que se acompañen de un proceso inflamatorio como la reparación de herida, enfermedades inflamatorias agudas y crónicas o el crecimiento de un tumor primario y/o metastásico. Estas quimiocinas son producidas en el tejido inflamado por células residentes e inflamatorias en respuesta a moléculas proinflamatorias o al contacto con agentes patógenos. Su papel principal es controlar y detener la inflamación, pero en determinadas condiciones también pueden actuar como factores patogénicos esenciales y proinflamatorios. Ejemplo de ello su participación en la respuesta inflamatoria de la artritis reumatoide, pancreatitis crónica, bronquitis asmática, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática y determinados tumores (Nickoloff, Mitra y col. 1994; Berg, Davidson y col. 1996; Arenberg, Polverini y col. 1997; Keane, Arenberg y col. 1997; Walz, Schmutz y col. 1997). En estos casos se ha visto que tras el estímulo inicial se produce una expresión de quimiocinas inapropiada y exagerada responsable de un mayor daño tisular final. De esta forma, el efecto protector inicial de las quimiocinas ante una inflamación acaba transformándose en una de las principales causas que fomentan su persistencia. Es en este contexto donde el uso de antagonistas o inhibidores

de quimiocinas se considera como una fuente importante de tratamiento (Gerard y Rollins 2001).

Existe otro grupo de quimiocinas que hacen uso de sus propiedades quimioatrayentes para participar en procesos no inflamatorios. Los más estudiados son la regulación del tráfico linfocitario basal, el desarrollo de las células T y B, y su función en la compartimentalización celular dentro de los tejidos linfoides en áreas con linfocitos T versus áreas con linfocitos B (Rossi y Zlotnik 2000).

### **1.3.3 QUIMIOCINAS Y TUMORES**

En los procesos neoplásicos existe un extenso entramado de quimiocinas y receptores de quimiocinas cuya producción, expresión y señalización están alteradas (Vicari y Caux 2002). Este desequilibrio es determinante para la supervivencia, crecimiento y diseminación tumoral. Las principales funciones biológicas derivadas de la interacción ligando-receptor durante el desarrollo tumoral están resumidas en la tabla 2. Las más relevantes son aquellas relacionadas con el crecimiento y diseminación del tumor (Balkwill 2003).

1. Control migración selectiva células tumorales
2. Control crecimiento y proliferación tumoral
3. Control infiltración leucocitaria tumoral
4. Regulación angiogénesis
6. Estimulación adhesión e invasión tumoral
5. Manipulación respuesta inmune tumoral

**Tabla 2 :** Principales funciones biológicas de la interacción quimiocinas-receptor en el proceso neoplásico

La acción más conocida de las quimiocinas es su participación en la *migración selectiva* de distintos tipos de células hacia tejidos determinados, fenómeno conocido como “homing”. Esta habilidad quimiotáctica fue descubierta por primera vez al identificar que ciertas quimiocinas eran capaces de inducir la migración direccional de los leucocitos bajo la influencia de una serie de estímulos proinflamatorios (Baggiolini 1998; Campbell y Butcher 2000). Más adelante se comprobó que también participaban en la migración y reclutamiento de otras células del sistema inmunitario (monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, natural killer, etc) y tumorales. Una vez secretadas, las quimiocinas se unen a las proteínas de la matriz extracelular del órgano que las ha sintetizado. La mayoría de la producción permanece allí inmovilizada sin pasar al torrente sanguíneo, acumulándose y creando un gradiente de concentración que indica la dirección de migración al lugar donde la célula estimulada es requerida. Debido al inmenso número de quimiocinas y a su promiscuidad en la unión ligando-receptor, en muchos casos es difícil llegar a entender cual es el verdadero papel de cada una de ellas en las distintas migraciones celulares. Basándose en esta acción quimiotáctica de las quimiocinas, se formuló la hipótesis de que el mismo mecanismo biológico podría estar implicado en el patrón metastásico no randomizado de un importante número de tumores. Es decir que la migración selectiva de las células tumorales hacia determinados órganos está determinada por la expresión de receptores de quimiocinas en las células metastásicas y de quimiocinas en las células de los órganos diana secundarios. Desde entonces han sido varios los estudios que han mostrado evidencias apoyando esta teoría. Se ha demostrado in vivo e in vitro como las células malignas neoplásicas expresan de forma específica y no randomizada uno o más receptores de quimiocinas que responden a un gradiente de concentración de sus respectivos ligandos movilizandando la célula tumoral, por vía hemática o linfática, hacia los órganos metastáticos donde de forma característica la expresión de quimiocinas se encuentra aumentada. Cada vez son más los tumores en los que se ha logrado establecer esta relación entre la expresión quimiocina/receptor y la movilización de las células tumorales hacia sus lugares metastáticos preferidos.

Además de la secreción de quimiocinas por los órganos diana metastáticos, las quimiocinas también pueden ser secretadas por las mismas células cancerígenas a nivel del foco primario y secundario. En este caso actúan de forma autocrina y/o paracrina,

participando directamente en la *proliferación tumoral* como factores de crecimiento y de forma indirecta potenciando la *angiogénesis tumoral* (Kulbe, Levinson y col. 2004; Opdenakker y Van Damme 2004).

La presencia de leucocitos en algunos tumores se considera un factor de mal pronóstico por ser una potencial fuente de factores de crecimiento y angiogénicos así como la evidencia de una respuesta inmune ineficaz del huésped que favorece la invasión y la extensión de la enfermedad. En contrapartida, en otros tumores como el melanoma maligno cutáneo, la infiltración leucocitaria se asocia a un pronóstico favorable capaz de favorecer el rechazo y apoptosis de las células neoplásicas. Son varios los estudios que han logrado relacionar la presencia de una extensa red de quimiocinas en el microambiente tumoral, producida por las células neoplásicas y estromales, con la atracción de linfocitos T que poseen receptores de quimiocinas (Kulbe, Levinson y col. 2004). El resultado de estas investigaciones en modelos animales e in vitro se ha acompañado en varios casos de una inhibición del crecimiento tumoral al conseguir un aumento de la concentración de linfocitos en el foco neoplásico. Este hecho ha creado expectativas en el campo de la inmunoterapia a favor del desarrollo de vacunas basadas en linfocitos T-quimiocina positivos capaces de rechazar las células neoplásicas.

La angiogénesis requiere la migración selectiva de las células endoteliales. Un número considerable de quimiocinas CXC son capaces de modular la angiogénesis tumoral, favoreciendo la formación de neovasos que garantizan un adecuado soporte de nutrientes y oxígeno a las células cancerígenas a nivel del tumor primario y metástasis, y facilitan su extravasación y diseminación general. De esta forma las quimiocinas contribuyen al crecimiento de los diferentes focos tumorales y a la extensión de la enfermedad. Varias investigaciones han comprobado la existencia de un desequilibrio en el microambiente tumoral entre las quimiocinas promotoras de la angiogénesis (CXC-ELR) y las quimiocinas antiangiogénicas (CXC-no ELR). Unos niveles elevados de quimiocinas CXCL-ELR se asociarían a una importante vascularización tumoral, mientras una mayor expresión de CXC-no ELR se traduciría con un efecto antiangiogénico (Arenberg, Polverini y col. 1997; Strieter, Belperio y col. 2004; Strieter, Burdick y col. 2005). Una excepción es la quimiocina CXCL12, que a pesar de

ser ELR negativa, estimula la proliferación de células endoteliales al unirse a su receptor CXCR4 (Gupta, Lysko y col. 1998).

Otra de las funciones de las quimiocinas es contribuir en la adhesión celular a la pared endotelial y promover su cambio estructural (aplanamiento, pseudópodos, etc...). De esta forma facilitan el paso de las células que expresan el receptor de quimiocina desde el torrente sanguíneo hacia la matriz extracelular y logran las variaciones morfológicas necesarias para el desplazamiento y posicionamiento de las células dentro del tejido, a favor de un gradiente de concentración y en respuesta a otros factores quimiotácticos. Cada una de estas etapas puede estar mediada por una quimiocina y un receptor distinto. En los tumores, la interacción de las células circulantes malignas con el endotelio vascular constituye un paso crucial en la extravasación e invasión celular de un órgano diana. Las moléculas de adhesión, y en particular las integrinas, juegan un papel crítico en esta etapa pero de forma basal poseen una escasa afinidad hacia sus ligandos, en este caso las células endoteliales. Las quimiocinas y sus receptores no solo han demostrado ser útiles a la hora de incrementar dicha afinidad, sino que también aumentan la expresión de las integrinas y su capacidad adhesiva, necesaria para hacer frente a la fuerza del torrente circulatorio, contribuyendo así en la invasión tumoral (Opdenakker y Van Damme 2004).

Algunas quimiocinas, en particular las quimiocinas CC, son capaces de activar una respuesta inmune específica contra tumores que de entrada son poco inmunogénicos. Este tipo de quimiocina tiene una acción quimiotáctica hacia los monocitos y células dendríticas, principales responsables de la inmunidad específica, y pueden generar una reacción de rechazo por parte del organismo hacia las células cancerígenas. Esto es especialmente interesante en la inmunoterapia, cuyo principal obstáculo es la baja inmunogenicidad basal de muchas neoplasias (Laning, Kawasaki y col. 1994; Nakashima, Oya y col. 1996).

### **1.3.4 QUIMIOCINA CXCL12 Y SU RECEPTOR CXCR4**

El CXCR4 es el receptor de quimiocina que ha sido identificado en el mayor número de células tumorales. Se han localizado más de 23 tipos de neoplasias cuyas células expresan dicho receptor. En algunos casos, las células cancerígenas co-expresan el CXCR4 junto a otros receptores de quimiocinas del tipo CC o CXC (Kulbe, Levinson y col. 2004).

El CXCR4 responde de forma específica a su ligando la quimiocina CXCL12 o SDF1- $\alpha$  (*Stromal Cell Derived Factor -1 $\alpha$*  o Factor derivado del estroma-1 $\alpha$ ). Contrastando con la promiscuidad observada entre quimiocinas y receptores de quimiocinas, el CXCR4 es el único receptor para el CXCL12 y el CXCL12 es el único ligando para el CXCR4.

Es importante recalcar que ni el CXCR4 ni el CXCL12 son considerados marcadores tumorales específicos, ni el fallo en su expresión ha sido detectado en todos los cánceres estudiados (Mitra, Shibuta y col. 1999; Sun, Wang y col. 2003).

La expresión de CXCL12, al igual que la de su receptor, puede variar en función de las neoplasias y el momento de la enfermedad. En algunos casos se localiza únicamente en el microambiente del tumor primario, en otros sólo se encuentra en el foco metastásico, y por último su expresión puede aparecer en ambas localizaciones (Kulbe, Levinson y col. 2004).

La quimiocina CXCL12 y su receptor han sido identificadas en tejidos no patológicos y juegan un papel importante en situaciones fisiológicas como el desarrollo fetal, la movilización de las stem cells hematopoyéticas y el tráfico basal de linfocitos (Rossi y Zlotnik 2000). Modelos animales han demostrado como la ausencia de expresión del CXCR4 o de su quimiocina CXCL12 durante la vida embrionaria puede ser letal por defectos en el desarrollo de los sistemas hematopoyético y cardiovascular (Tachibana, Hirota y col. 1998; Zou, Kottmann y col. 1998). Las propiedades quimiotácticas del complejo CXCR4/CXCL12 son utilizadas para dirigir la migración de los linfocitos T y B, megacariocitos, monocitos y neuronas (Bleul, Fuhlbrigge y col. 1996; D'Apuzzo, Rolink y col. 1997; Hamada, Mohle y col. 1998).

Pero posiblemente de todas las funciones del complejo CXCR4/CXCL12, las que han despertado mayor interés dentro de la comunidad científica han sido sus efectos en las diferentes etapas biológicas de las neoplasias, donde parecen jugar un papel muy importante en varios pasos del crecimiento y diseminación tumoral. De esta forma, las investigaciones han llegado a demostrar como la interacción CXCR4/CXCL12 favorece la migración celular, la proliferación y angiogénesis en el tumor primario y órganos metastásicos, la adhesión endotelial y la invasión tisular mediante diversos mecanismos, algunos de los cuales han sido explicados en el apartado anterior y otros que serán explicados a continuación. (Taichman, Cooper y col. 2002; Zhou, Larsen y col. 2002; Smith, Luker y col. 2004).

En pacientes oncológicos, lo primero que se estudio fueron las consecuencias de la interacción de esta quimiocina con su receptor en la migración metastásica selectiva en un elevado número de tumores. En ellos se comprobó la existencia de un aumento en la producción de la quimiocina CXCL12 a nivel de órganos metastásicos diana como el hígado, pulmón, médula ósea o sistema nervioso central (SNC) junto a un incremento de la expresión del receptor CXCR4 en las células tumorales. La unión de ambas moléculas desencadena una serie de reacciones intracelulares que activan, potencian y dirigen una migración celular específica. Entre los tumores estudiados cabe destacar el cáncer de mama (Youngs, Ali y col. 1997; Muller, Homey y col. 2001; Fernandis, Prasad y col. 2004), ovario (Scotton, Wilson y col. 2002), próstata (Taichman, Cooper y col. 2002; Sun, Wang y col. 2003), páncreas (Koshiba, Hosotani y col. 2000), pulmón (Phillips, Burdick y col. 2003), melanoma maligno cutáneo (Murakami, Maki y col. 2002), riñón (Schrader, Lechner y col. 2002), neuroblastoma (Geminder, Sagi-Assif y col. 2001), glioblastoma (Rempel, Dudas y col. 2000), leucemia (Burger, Burger y col. 1999), linfomas (Arai, Yasukawa y col. 2000), mieloma múltiple (Sanz-Rodriguez, Hidalgo y col. 2001) y el rhabdomiosarcoma (Libura, Drukala y col. 2002). Apoyando estas investigaciones, varios estudios in vitro con líneas celulares cancerígenas que expresan CXCR4 han demostrado que la activación de dicho receptor con CXCL12 estimula la migración específica de las células así como la invasión a través del matrigel o monocapas de células endoteliales, fibroblastos o células estromales de médula ósea a

favor de un gradiente de concentración (Koshiba, Hosotani y col. 2000; Geminder, Sagi-Assif y col. 2001; Scotton, Wilson y col. 2002; Cardones, Murakami y col. 2003).

Por otro lado, la expresión de la quimiocina CXCL12 por las mismas células neoplásicas en el interior del microambiente del foco primario de algunos tumores como o en ciertas líneas celulares *in vitro* hizo pensar que el ligando CXCL12 podría jugar también un papel importante en la lesión primaria (Kulbe, Levinson y col. 2004). Son varios los cánceres en que la acción del complejo CXCR4/CXCL12 estimula la proliferación celular *in vivo* o *in vitro* promoviendo la supervivencia del tumor. Ejemplo de ello son el cáncer de próstata, ovario, melanoma maligno cutáneo, glioblastoma y mieloma múltiple (Hideshima, Chauhan y col. 2002; Murakami, Maki y col. 2002; Zhou, Larsen y col. 2002; Sun, Wang y col. 2003). Cabe también mencionar que estudios en hepatomas y carcinomas del tracto digestivos no apoyan la función tumorigénica de la interacción CXCL12/CXCR4 y consideran dicha quimiocina como un gen de supresión tumoral.

Scotton y col demostraron como tras la estimulación con CXCL12 varias líneas celulares del cancer de ovario aumentaban su expresión de la integrina  $\beta 1$  incrementando así la adhesión celular a la fibronectina (Scotton, Wilson y col. 2001). Desde entonces se ha visto que la quimiocina CXCL12 es capaz de estimular de forma rápida y transitoria la capacidad adhesiva de otras integrinas y moléculas de adhesión endotelial como el VLA4 y LFA-1 a la pared endotelial (Burger, Glodek y col. 2003; Rolli, Fransvea y col. 2003; Shimonaka, Katagiri y col. 2003). Además la CXCL12 aumenta la expresión de una metaloproteinasa, la MMP9 (metaloproteinasa 9), que facilita el tránsito celular a través del endotelio y su membrana basal, contribuyendo de esta forma en la invasión tisular. La acción de la CXCL12 está estrechamente relacionada con la polimerización de actina, que junto con la formación de pseudopodia, permiten el desplazamiento celular en el interior del tejido (Benovic y Marchese 2004).

Mencionar que han sido varias las investigaciones que han relacionado los niveles de expresión del receptor CXCR4 en algunos procesos neoplásicos con otros factores involucrados en la progresión tumoral como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF-alpha) (Szlosarek y Balkwill 2003).

Como ya se ha comentado con anterioridad, la quimiocina CXCL12 es la única quimiocina CXC-ERL negativa con propiedades angiogénicas. Además es la quimiocina del grupo CXC con mayor capacidad quimioatrayente para células endoteliales y su receptor, el CXCR4, es el receptor de quimiocina mayoritariamente expresado por las células endoteliales (Salcedo y Oppenheim 2003). Por otro lado, la interacción CXCL12-CXCR4 es la única que ha demostrado ser estrictamente necesaria en algunos tipos de angiogénesis. Son varios los estudios in vivo que han logrado la formación de neovasos bajo el estímulo de la CXCL12. La expresión del CXCR4 en las células endoteliales humanas aumenta bajo el estímulo del factor de crecimiento endotelial (VEGF) y factor de crecimiento fibroblasto básico (bFGF), haciendo que las células endoteliales sean más sensibles al efecto de la quimiocina CXCL12 (Salcedo y Oppenheim 2003).

Por último mencionar que recientemente se han utilizado con éxito antagonistas de la quimiocina CXCL12 y del receptor CXCR4 como tratamiento en modelos animales. Se ha comprobado como los anticuerpos anti-CXCR4 y anti-CXCL12 son capaces de reducir considerablemente la extensión metastásica tumoral en neoplasias de mama, ovario y melanoma (Muller, Homey y col. 2001; Murakami, Maki y col. 2002; Scotton, Wilson y col. 2002).

### **1.3.5 CXCR4/CXCL12 Y MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO**

El receptor de quimiocinas, CXCR4, se expresa en las células humanas del melanoma maligno cutáneo y su ligando, la quimiocina CXCL12, aparece con frecuencia hiperproducida en los principales lugares metastáticos de dicho tumor (pulmón, cerebro, hígado y piel). Han sido varios los estudios realizados en modelos animales e in vitro para intentar descubrir cuales son las funciones ejercidas por el complejo CXCR4/CXCL12 dentro del proceso tumoral del melanoma maligno de la piel. Murakami y su equipo han estudiado mucho sobre el tema y demostraron in vivo como mediante la transfección de células de melanoma B16 con CXCR4 se conseguía una hiperexpresividad del receptor responsable de un aumento en el número de metástasis en el pulmón, órgano en el que existe una alta concentración de quimiocina CXCL12.

Sin embargo, este fenómeno no se producía a nivel ganglionar donde la expresión de CXCL12 es baja. Este hecho apoya la implicación de estas moléculas en la migración selectiva metastásica a través de un gradiente de concentración gracias a sus propiedades quimiotácticas (Murakami, Maki y col. 2002; Murakami, Cardones y col. 2004).

Existen otras acciones del complejo CXCR4/CXCL12 involucradas en el melanoma maligno cutáneo que también han sido estudiadas. La primera es la capacidad del ligando CXCL12 para estimular la proliferación celular B16-CXCR4 in vitro bajo condiciones de estrés, sugiriendo las ventajas de supervivencia y crecimiento que aporta al tumor (Murakami, Maki y col. 2002). La segunda es su capacidad para aumentar la afinidad de la beta1-integrina en las células tumorales, aumentando así su adherencia a la pared vascular y facilitando la invasión neoplásica como ya se ha explicado previamente (Cardones, Murakami y col. 2003). Otra acción descubierta in vitro es la de potenciar la migración de linfocitos T que expresan el CXCR4 a través de varias capas hasta alcanzar las células de melanoma productoras de la quimiocina CXCL12. Esta migración es dependiente de CXCL12 y conlleva la apoptosis de las células tumorales, lo cual resulta atractivo en la creación de nuevas estrategias terapéuticas.

Recientemente se han publicado dos estudios que demuestran la existencia de una asociación entre los niveles de expresión del CXCR4 en muestras de melanoma maligno cutáneo con el pronóstico clínico de los pacientes. En ellos se concluye que cuanto mayor es la expresión del receptor CXCR4 en las células tumorales, mayor es el riesgo de crecimiento tumoral local y a distancia, y peor la supervivencia (Scala, Ottaiano y col. 2005).

### **1.3.6 CXCR4/CXCL12 Y MELANOMA MALIGNO DE ÚVEA**

Según nuestro conocimiento, hasta la fecha no se ha realizado ninguna investigación que haya estudiado la expresión, las funciones y el valor pronóstico del complejo CXCR4/CXCL12 en el melanoma maligno de úvea.

#### **1.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA**

Para obtener preparaciones permanentes que después puedan ser teñidas y visualizadas bajo el microscopio óptico, las muestras de tejido deben ser sometidas a varios procedimientos histológicos que incluyen la fijación, deshidratación, aclaramiento e inclusión.

A fin de preservar la estructura tridimensional y la localización de los antígenos, los tejidos deben ser tratados con un fijador que inmovilice las células y detenga los procesos de autólisis. Además la mayoría de fijadores tienen propiedades bactericidas que permiten eliminar aquellos microorganismos que contribuyen en la degradación celular. El agente más usado en la *fijación* es el formol debido a su rápida penetración, bajo coste y adecuada preservación de la gran mayoría de antígenos.

Antes de ser incluida, la pieza debe primero *deshidratarse* (en general con alcohol etílico) y después *aclararse* para eliminar el exceso de alcohol (en general con xilol). Entonces se coloca el tejido en un recipiente donde se vierte parafina líquida. Al enfriarse y solidificarse la parafina, se obtienen bloques sólidos, o tacos, que pueden ser cortados mediante un microtomo en secciones lo suficientemente delgadas (5-10 $\mu$ ) para permitir el paso de la luz. Los cortes obtenidos se montan entonces sobre un portaobjetos.

#### **1.5 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para ser observados bajo el microscopio óptico, el tejido debe teñirse. Para ello, primero se debe deparafinar la muestra mediante xileno y rehidratar progresivamente el tejido con concentraciones alcohólicas decrecientes. Tras finalizar la tinción, se agregará un líquido de montaje no acuoso y se cubrirá con un cubre-objetos para lograr una preparación permanente.

### **1.5.1 Coloración de hematoxilina-eosina (H&E)**

La tinción con H&E es la más utilizada en histopatología. La *eosina* es un colorante ácido que se asocia y colorea las estructuras catiónicas tales como los filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras extracelulares permitiendo distinguir los detalles del citoplasma celular (color rosado o rojo). La *hematoxilina* actúa como colorante básico, por lo cual se asocia y colorea estructuras aniónicas identificando las estructuras finas del núcleo (color azul o púrpura).

### **1.5.2 Ácido Periódico-Schiff**

El *ácido periódico* rompe la unión entre carbonos con hidroxilos adyacentes, y forma grupos aldehídos para dar un color rojo púrpura intenso. La reacción de PAS tiñe carbohidratos y se usa para detectar gránulos de glucógeno, moco celular, membrana basal de los epitelios y fibras reticulares del tejido conectivo. Al reaccionar con la membrana basal periendothelial, la tinción con PAS ha demostrado ser el procedimiento idóneo en la identificación de patrones vasculares tumorales. Una de las técnicas de tinción PAS más utilizadas es la llamada “*Gold Standard*”. En ella, se blanquea la melanina (en general con permanganato potásico al 0,25% o ácido oxálico al 5%), no se aplica una contratinción con hematoxilina y el resultado se visualiza bajo un filtro verde oscuro que aumenta el contraste.

## **1.6 INMUNOHISTOQUÍMICA**

La inmunohistoquímica (IHQ) consiste en la identificación in situ de antígenos celulares o tisulares mediante anticuerpos marcados. Es una técnica diagnóstica y de investigación que permite visualizar la distribución y localización de componentes celulares específicos dentro de una célula o tejido.

### **1.6.1 Tipos de anticuerpos**

Existen dos tipos de anticuerpos: policlonales y monoclonales. Los *anticuerpos policlonales* se obtienen a través la inmunización de animales (en general conejos) a los que se inyecta el antígeno correspondiente. Son anticuerpos con diferentes afinidades y con una baja especificidad ya que reaccionan con varios epítomos o determinantes antigénicos. Los *anticuerpos monoclonales* se obtienen mediante la fusión de células productoras de anticuerpos o plasmocitos con células inmortales de mieloma. Las células fusionadas (hibridomas) se cultivan y producen gran cantidad de inmunoglobulinas idénticas a las que producía el plasmocito. La principal ventaja que ofrecen es su especificidad ya que sólo reconocen un único epítomo.

### **1.6.2 Técnicas de IHQ**

Existen diferentes técnicas de inmunohistoquímica que pueden clasificarse en directas o indirectas. En las *técnicas directas*, el anticuerpo específico que va a reconocer el antígeno que se desea identificar está conjugado a un marcador. En las *técnicas indirectas* se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado (anticuerpo primario) y en una segunda fase un anticuerpo marcado (anticuerpo secundario) que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario (García del Moral 1993).

### **1.6.3 IHQ enzimática**

Los fluorocromos, enzimas, iones metálicos coloidales o isótopos radioactivos son las sustancias utilizadas en IHQ como marcadores o trazadores que permiten identificar la reacción antígeno-anticuerpo en el tejido estudiado.

La *IHQ enzimática* es, junto con la inmunofluorescencia, el método de inmunodetección más ampliamente usado. Se trata de una técnica de inmunotinción que utiliza una enzima como marcador. La reacción de la enzima con un sustrato cromógeno producirá un precipitado de color localizando donde está el complejo antígeno-anticuerpo (García del Moral 1993).

Hoy en día, la *peroxidasa*, molécula obtenida a partir del rábano picante, es el trazador enzimático más utilizado. Entre las técnicas de *inmunoperoxidasa*, el método de complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) es el que ha demostrado la máxima sensibilidad. Se basa en la fuerte afinidad de la avidina por la biotina. La *avidina* es una glucoproteína de alto peso molecular formada por cuatro subunidades, que configuran una estructura terciaria con cuatro lugares de unión. La *biotina* es una pequeña molécula vitamínica que se conjuga fácilmente con anticuerpos y enzimas marcadores. Más de 150 moléculas de biotina pueden llegar a unirse a un único anticuerpo (García del Moral 1993).

El método ABC consiste en la aplicación en primer lugar un anticuerpo primario no marcado, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado, y por último un complejo avidina-biotina-peroxidasa. Este complejo debe tener al menos uno de los cuatro lugares de unión de la avidina libre para que se pueda unir a las moléculas de biotina acomplejadas al anticuerpo secundario.

El siguiente paso es el revelado mediante el cual se podrá visualizar y localizar el complejo. Para ello es necesario añadir un sustrato enzimático o cromógeno en el medio. Existen varios cromógenos como la diaminobenzidina (DAB), el 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), el 4 cloro-naftol y la tetrametilbenzidina (TMB). El cromógeno más usado en el estudio del melanoma uveal es el AEC puesto que da una coloración rojiza que permite distinguirla de la melanina. El problema del AEC es que forma precipitados inestables que se disuelven en la secuencia de pasos etanol-xileno. Por ello, los tejidos tratados con AEC deben ser montados directamente sin ser hidratados.

#### **1.6.4 Aspectos técnicos de la IHQ enzimática**

La *recuperación antigénica* es un sistema de desenmascaramiento de epítomos o lugares antigénicos que quedaron enmascarados por el uso de formol durante la preparación de los tejidos. Para ello, se pueden utilizar tratamientos con enzimas proteolíticas (tripsina, pepsina) o calor (olla a presión, microondas).

La peroxidasa es una enzima presente de forma habitual en las muestras de melanoma de úvea. Para evitar que el sustrato la reconozca creando falsos positivos, por una

tinción de fondo excesiva, debe realizarse *el bloqueo de la peroxidasa endógena* tisular antes de la inmunotinción. Existen varios métodos que permiten bloquearla como la fenilhidracina y ázida sódica, pero el más comúnmente utilizado es el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en metanol.

El *bloqueo de uniones inespecíficas* evita la tinción generada por interacciones iónicas e uniones hidrofóbicas. Se logra saturar estos lugares de unión mediante el tratamiento de la muestra con sustancias como el Tritón X-100, suero preinmune de especie donadora del segundo anticuerpo, albúmina sérica bovina o suero fetal bovino.

Y por último, es importante incluir *controles positivos y negativos* para cada anticuerpo del estudio. Los controles positivos consisten en la inmunotinción de tejidos en los que sabemos que existe una gran cantidad del antígeno que buscamos. Los controles negativos son las mismas secciones del tejido que estamos estudiando pero en las que se omite la aplicación del anticuerpo primario, siendo el resto de las etapas de la inmunotinción idénticas.

## **2. PROPÓSITO**

---

Identificar nuevos factores pronósticos moleculares que permitan conocer el riesgo individual de desarrollar metástasis en los pacientes con melanoma maligno de úvea y desarrollar nuevas vías terapéuticas.

### **3. HIPÓTESIS**

---

La quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 se expresan en el melanoma maligno de úvea y poseen un importante papel como indicadores pronósticos metastásicos.

## **4. OBJETIVOS**

---

1. Estudiar la expresión inmunohistoquímica de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en el melanoma maligno de úvea.
2. Describir la relación existente entre los niveles de expresión de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 con la presencia de metástasis en pacientes con melanoma maligno de úvea.
3. Analizar la relación existente entre la expresión de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 y otras variables clínico-patológicas de mal pronóstico conocidas en el melanoma maligno de úvea.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **5.1 SUJETOS**

Treinta y un pacientes del “*Royal Victoria Hospital*” (“*McGill University Health Centre*”, Montreal, Canadá) diagnosticados de melanoma maligno primario de úvea fueron incluidos en el estudio basándose en la disponibilidad de información clínico-patológica y tejido representativo.

La historia clínica de cada uno de los pacientes fue revisada a partir de la base de datos del Registro de Cáncer obteniendo la información necesaria sobre los siguientes parámetros: sexo, edad al diagnóstico, diámetro basal tumoral al diagnóstico, tratamiento realizado, detección y localización de metástasis y tiempo de seguimiento.

### **5.2 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS**

De cada caso, se localizaron los bloques de parafina de los que se obtuvieron las láminas necesarias para realizar el estudio. Una lámina de cada tumor fue teñida con Hematoxilina y Eosina para el estudio de la infiltración linfocitaria y otra con Ácido Periódico Schiff para el estudio de los círculos vasculares cerrados (CVC). A continuación, se detallan de forma exacta los pasos y tiempos seguidos y los reactivos usados en cada proceso (Tablas 3 y 4).

- 1 Deparafinado de las láminas con Xileno: 3 cambios de 5 minutos
- 2 Hidratación de la muestra
  - a Etanol 100%: 5 minutos
  - b Etanol 95%: 5 minutos
  - c Etanol 80%: 5 minutos
  - d Agua corriente: 5 minutos
  - e Agua destilada: 5 minutos
- 3 Teñir con Hematoxilina (Harris Formula, Surgipath, Richmond, IL, USA): 5 minutos
- 4 Lavar con agua corriente: 10 minutos
- 5 Sumergir varias veces en HCl 1% en etanol 70%
- 6 Sumergir en agua amoniacada 0,5% (28% NH<sub>4</sub>OH en 0,5ml en 100ml H<sub>2</sub>O) para azular
- 7 Lavar con agua corriente: 1 minuto
- 8 Contrastar con solución de eosina (Eosin, Surgipath, Richmond, IL, USA) : 3 minutos
- 9 Lavar el exceso de colorante con agua corriente: 10 minutos
- 10 Deshidratar la muestra
  - a Etanol 95%: 5 minutos
  - b Etanol 95%: 5 minutos
  - c Etanol 100%: 5 minutos
- 11 Aclarar con Xileno: 2 cambios de 5 minutos cada uno
- 12 Montar en un medio no acuoso de Permount (SP15-100, Fisher Scientific International Inc)

**Tabla 3 :** *Protocolo Tinción Hematoxilina-Eosina.* NH<sub>4</sub>OH: Hidróxido de amonio

- 1 Deparafinado de las láminas con Xileno: 3 cambios de 5 minutos
- 2 Hidratación de la muestra
  - a Etanol 100%: 5 minutos
  - b Etanol 95%: 5 minutos
  - c Etanol 80%: 5 minutos
  - d Agua corriente: 5 minutos
  - e Agua destilada: 5 minutos
- 3 Oxidar con Ácido Periódico de Schiff (American Chemicals, LTD, Montreal, CA) en solución acuosa al 1%: 10 minutos
- 4 Lavar con agua destilada: 10 minutos
- 5 Tratar con Reactivo de Schiff (Surgipath, Richmond, IL, USA): 20 minutos
- 6 Sumergir en ácido sulfúrico: 3 cambios de 2 minutos
- 7 Lavar con agua corriente: 5 minutos
- 8 Teñir con Hematoxilina (Harris Formula, Surgipath, Richmond, IL, USA): 1 minuto
- 9 Sumergir en agua con HCl al 1% para enrojecer
- 10 Sumergir en agua amoniacada 0,5% (28% NH<sub>4</sub>OH en 0,5ml en 100ml H<sub>2</sub>O) para azular
- 11 Lavar con agua corriente: 5 minutos
- 12 Deshidratar la muestra
  - a Etanol 95%: 5 minutos
  - b Etanol 95%: 5 minutos
  - c Etanol 100%: 5 minutos
- 13 Aclarar con Xileno: 2 cambios de 5 minutos cada uno
- 14 Montar en un medio no acuoso de Permunt (SP15-100, Fisher Scientific International Inc)

**Tabla 4:** Protocolo Tinción Ácido Periódico Schiff (PAS). HCl: Cloruro de hidrógeno, NH<sub>4</sub>OH: Hidróxido de amonio

### **5.3 INMUNOHISTOQUÍMICA**

El estudio de la inmunexpresión se llevó a cabo mediante el método indirecto de inmunoperoxidasa (ABC). Para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-humanos CXCL12 (Clon 79018, R&D System, Minneapolis, MN) y CXCR4 (Clon 44708, R&D System, Minneapolis, MN), anticuerpos secundarios biotinados antiratón (Cod. E0354, DAKO A/S, Dinamarca) y un sistema comercial del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Strept ABCComplex/HRP, Cod. K0377, DAKO A/S, Dinamarca) que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (1 gota del reactivo A con avidina y 1 gota del reactivo B con peroxidasa biotilada en 5ml de TBS). Debido a la fragilidad del tejido ocular, para la recuperación antigénica se utilizó una variante de las técnicas de calor que consiste en verter sobre la muestra buffer citrato (2,49gr Tri sodium citrato en 1000ml H<sub>2</sub>O, pH 6.0) llevado a ebullición y dejándolo actuar unos 15 minutos. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se usó Peróxido de Hidrógeno (Cod HX0635-2, EM Science, MERCK KGaA, Alemania) al 3% en metanol , y para bloquear las uniones inespecíficas BSA (Cod BP1605-100, Fisher Scientific International Inc). Como cromógeno se aplicó el 3-Amino-9-etil-carbazol (AEC) (Cod K3464, DAKO A/S, Dinamarca) puesto que su coloración rojiza permite distinguirlo de la melanina. Al ser el AEC soluble en alcohol, la pieza una vez teñida no puede ser nuevamente deshidratada, por lo que tras la contratinción con Hematoxilina (Gill II Formula, Surgipath, Richmond, IL, USA), todas las laminillas fueron montadas con un medio de montaje acuoso Faramount (S3025, DAKO A/S, Dinamarca). Los *controles negativos* se trataron en condiciones idénticas excepto que se omitió la aplicación del anticuerpo primario que fue sustituida por TBS (0,05 mol/L Tris-HCl, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,6). Como *controles positivos* se utilizaron muestras de tejido cerebral para el CXCR4 y lengua para el CXCL12.

Los pasos detallados de la realización de todo el proceso se encuentran en la Tabla nº 5.

- 1 Deparafinado de las láminas con Xileno: 3 cambios de 5 minutos
- 2 Hidratación de la muestra
  - a Etanol 100%: 5 minutos
  - b Etanol 95%: 5 minutos
  - c Etanol 80%: 5 minutos
  - d Agua corriente: 5 minutos
  - e Agua destilada: 5 minutos
- 3 Recuperación antigénica en buffer citrato (pH 6.0) hirviendo: 15 minutos
- 4 Dejar reposar a temperatura ambiente: 20 minutos
- 5 Lavado con agua destilada: 10 minutos
- 6 Inhibición de la actividad de la peroxidasa endógena en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol a temperatura ambiente: 10 minutos
- 7 Lavado con agua destilada: 5 minutos
- 8 Lavado en TBS (pH 7.6): 5 minutos
- 9 Bloqueo de uniones inespecíficas con 1% de BSA en TBS: 20 minutos
- 10 Aplicar los anticuerpos primarios:
  - a Dilución 1:100 en 1% de BSA en TBS de CXCR4
  - b Dilución 1:50 en 1% de BSA en TBS de CXCL12
- 11 Incubar en una cámara húmeda a 4° toda la noche
- 12 Lavados en TBS: 2 cambios de 5 min
- 13 Incubar con el anticuerpo secundario biotinado a temperatura ambiente: dilución 1:500 en 1% de BSA en TBS, 30 minutos
- 14 Lavados en TBS: 2 cambios de 5 min
- 15 Incubar con ABCComplej/HRP a temperatura ambiente: 30 minutos
- 16 Lavados en TBS: 2 cambios de 5 min
- 17 Revelado de la peroxidasa con el sustrato AEC: de 5 a 15 minutos en función de la intensidad del color controlada bajo microscopio
- 18 Lavado con agua destilada: 5 minutos
- 19 Contratinción con hematoxilina Gill II: 45 segundos
- 20 Lítio condensado
- 21 Lavado con agua corriente: 5 minutos
- 22 Lavado con agua destilada: 5 minutos
- 23 Montaje en un medio acuoso Faramount

**Tabla 5 :** Protocolo Inmunohistoquímica CXCR4 y CXCL12. IHQ enzimática. Método ABC (Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa). TBS: Solución salina tamponada de Tris, BSA: Albúmina sérica bovina, AEC: 3-amino-9-etil-carbazol

#### **5.4 CLASIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CXCR4 y CXCL12**

Tras la tinción inmunohistoquímica, todas las láminas fueron examinadas bajo microscopía óptica (microscopio de Carl Zeiss; modelo Axiophot El-Einsatz; n°451888) por dos examinadores del “*Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory - McGill University Health Centre*”. Durante la observación, los examinadores no poseían conocimiento alguno sobre la evolución de los pacientes, ni tampoco sobre los resultados de su primera evaluación o la evaluación del otro examinador. Se consideró como positivo cualquier tipo de tinción, independientemente de su localización e intensidad, y negativo la ausencia completa de tinción.

Los tumores fueron clasificados en:

Grupo 1: menos del 40% de las células neoplásicas del melanoma maligno de úvea fueron inmunorreactivas

- Grupo 1<sub>CXCL12</sub>: menos del 40% de las células neoplásicas del melanoma maligno de úvea inmunoexpresaron la quimiocina CXCL12
- Grupo 1<sub>CXCR4</sub>: menos del 40% de las células neoplásicas del melanoma maligno de úvea inmunoexpresaron el receptor CXCR4

Grupo 2: el 40% o más de las células neoplásicas del melanoma maligno de úvea fueron inmunorreactivas

- Grupo 2<sub>CXCL12</sub>: el 40% o más de las células tumorales del melanoma maligno de úvea inmunoexpresaron la quimiocina CXCL12
- Grupo 2<sub>CXCR4</sub>: el 40% o más de las células tumorales del melanoma maligno de úvea inmunoexpresaron el receptor CXCR4

## **5.5 ESTUDIO DE VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS**

Los parámetros histopatológicos analizados y la forma en que fueron estudiados se describen a continuación:

### **5.5.1 Tipo celular**

La celularidad de cada tumor fue analizada en las láminas teñidas con H&E de acuerdo con la clasificación de Callender (1931) modificada por McLean y col (1983). Los tumores fueron clasificados en dos categorías:

*Tumores Fusiformes*: predominio de células fusiformes

*Tumores Mixtos*: formados por células fusiformes y epitelioides

### **5.5.2 Infiltración linfocítica tumoral**

La presencia de infiltración linfocitaria fue clasificada en las láminas teñidas con H&E utilizando el siguiente criterio:

*ILT negativa*: menos de 20 linfocitos (aislados o difusos) en la muestra tumoral

*ILT positiva*: 20 o más linfocitos (aislados o difusos) en la muestra tumoral

### **5.5.3 Círculos vasculares cerrados**

Siguiendo la definición de Folberg y col, se buscaron los CVC como un patrón microvascular curvado y completamente cerrado. La presencia de un sólo CVC se consideró suficiente para afirmar la existencia de dicho patrón. Para una mejor identificación de los CVC se realizó previamente en todas las láminas una reacción del ácido periódico de Schiff (PAS). Los resultados fueron clasificados como:

CVC positivos: presencia de al menos un CVC

CVC negativos: ausencia absoluta de CVC

## **5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó con la versión 12.0 del programa estadístico *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), valorando como significativo  $p < 0,05$ . Para estudiar la correlación existente entre el desarrollo de metástasis y la expresión de CXCR4 y CXCL12 se utilizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y el test de Log-Rank. La asociación entre la expresión de CXCR4 y CXCL12 con el resto de parámetros clínico-patológicos fue determinada utilizando el test *t de Student* para el estudio de las variables cuantitativas y el test *Chi-Cuadrado* para las variables cualitativas.

## **6. RESULTADOS**

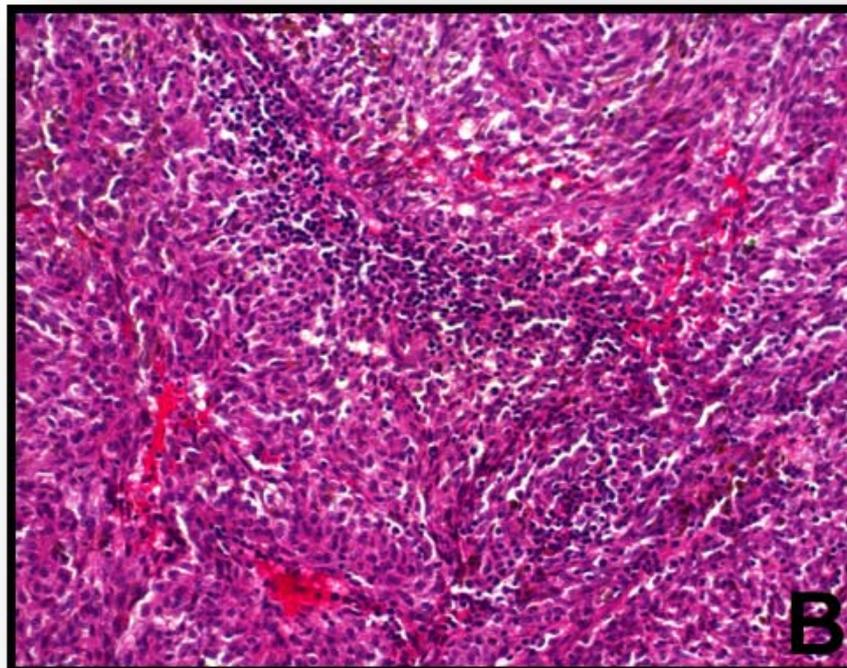
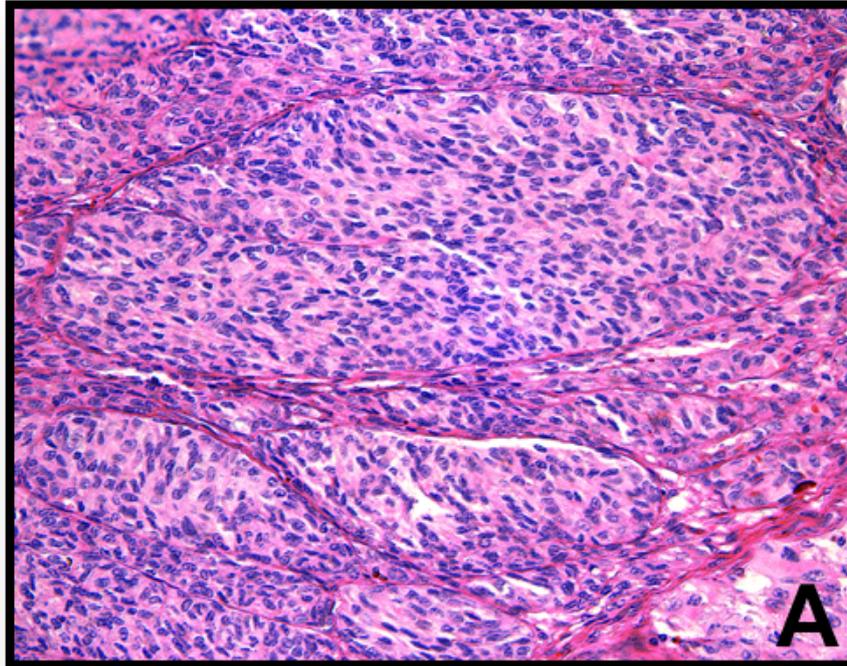
---

### **6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS**

En la presente tesis doctoral se incluyeron 31 pacientes diagnosticados de melanoma de coroides. Las principales características de la muestra analizada están resumidas en la tabla 6. Se estudiaron 18 hombres y 13 mujeres cuya media de edad fue de 60,4 años. El diámetro basal medio de los tumores fue de 13,6 mm. 15 pacientes recibieron tratamiento radioterápico previa enucleación, mientras que en 16 casos los ojos fueron enucleados directamente. A nivel histológico, 25 de los casos fueron melanomas de coroides mixtos y 6 casos fueron de tipo fusiformes. En 8 tumores se encontró una infiltración linfocitaria y 6 presentaron CVC (Figura 4). Tras un tiempo de seguimiento medio de 68,7 meses, 14 (45%) de los pacientes desarrollaron metástasis mientras que 17 (55%) pacientes finalizaron el estudio libres de enfermedad metastásica. El principal órgano metastásico fue el hígado (10 pacientes), seguido por el pulmón (4 pacientes) y el hueso (2 pacientes); 3 de los pacientes tuvieron múltiples lugares metastáticos.

Parámetros	Pacientes
Sexo (N, %)	
Hombre	18 (58%)
Mujer	13 (42%)
Edad al diagnóstico (años) (media, rango)	60.4 (41-81)
DBT (mm) (media, rango)	13,6 (5-24)
Tratamiento (N, %)	
RTA + Enucleación	15 (48%)
Enucleación	16 (52%)
Tipo celular (N, %)	
Fusiforme	6 (19%)
Mixto	25 (81%)
Infiltración linfocítica tumoral (N, %)	8 (26)
Círculos vasculares cerrados (N, %)	6 (19%)
Tiempo de seguimiento (meses) (media, rango)	68.7 (2-267)
Desarrollo metástasis	
Si	14 (45%)
No	17 (55%)
Localización metástasis (N)	
Hígado	10
Pulmón	4
Hueso	2
Múltiples	3

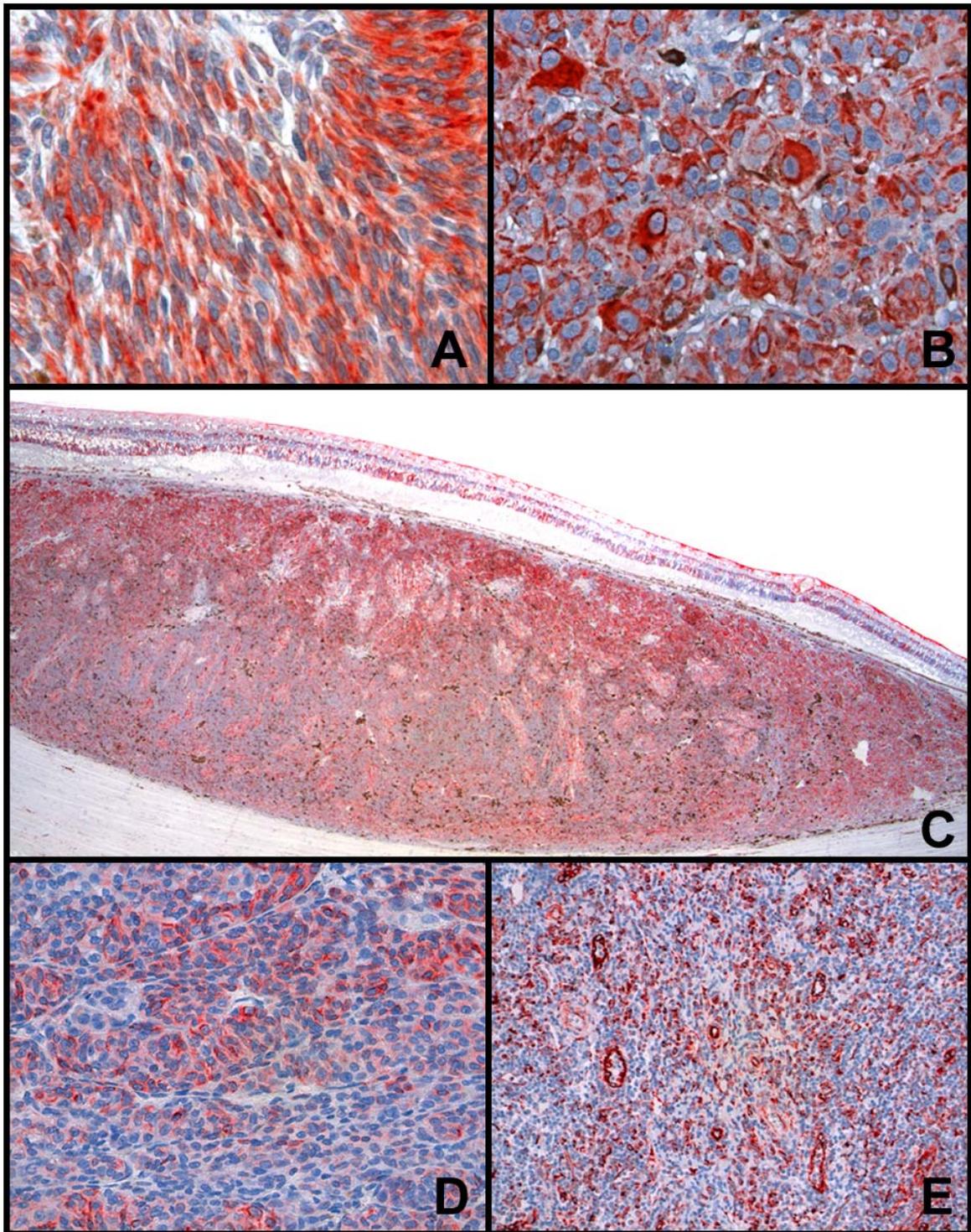
**Tabla 6 :** Resumen de los datos demográficos observados para las diferentes variables. DBT: Diámetro basal tumoral, RTA: Radioterapia



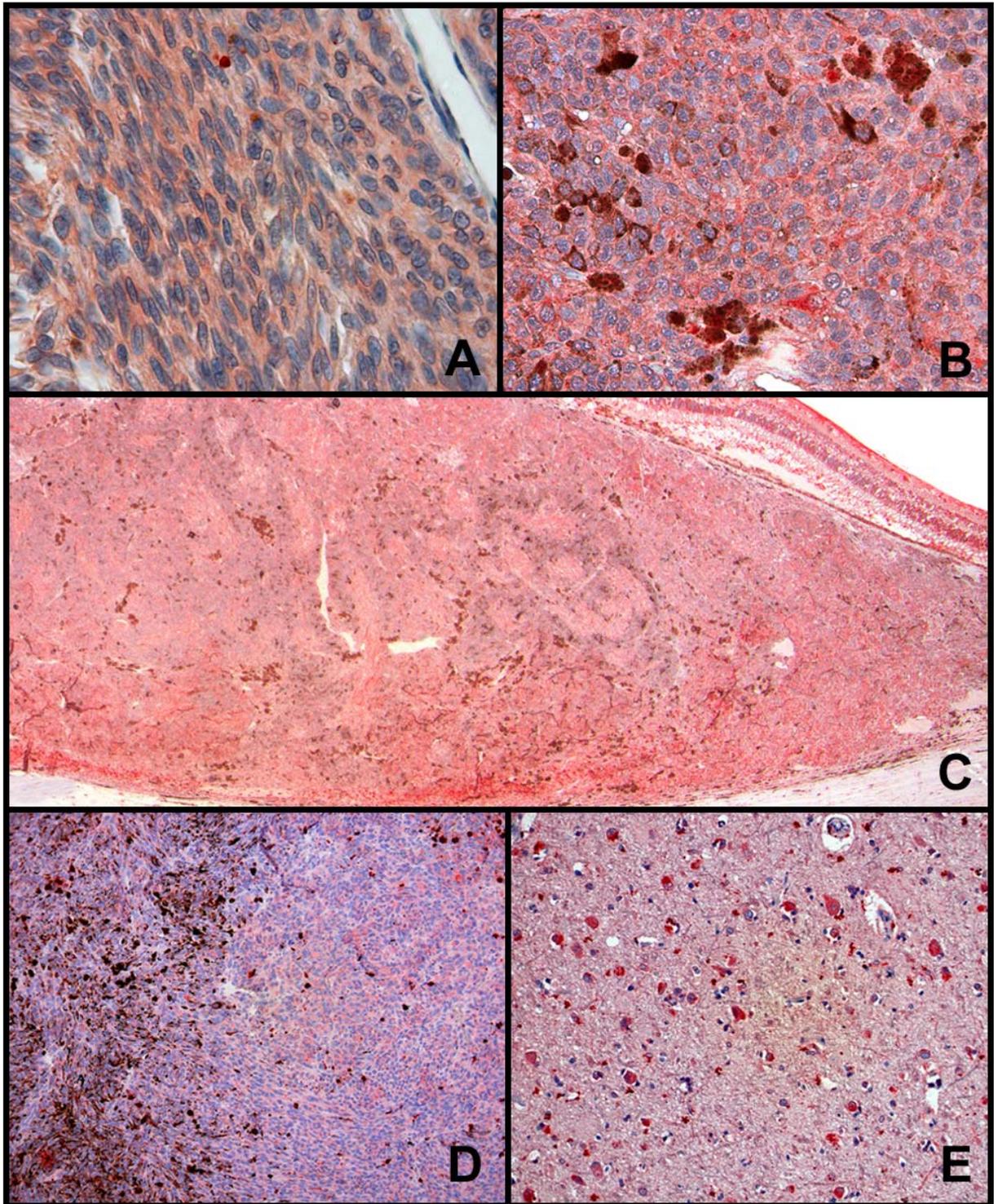
**Figura 4:** (A) Círculo vascular cerrado (PAS, magnificación original 200x). (B) Infiltración tumoral linfocitaria (H&E, magnificación original 200x)

## **6.2. INMUNOHISTOQUÍMICA**

La expresión inmunohistoquímica de CXCR4 y CXCL12 fue en todos los casos intracitoplásmica, afectando tanto a las células fusiformes como epitelioides (Figuras 5 y 6). La tinción de ambas moléculas fue moderada-intensa expresándose de forma focal o difusa en función del tumor estudiado. También se observó una tendencia de las células con tinción positiva a localizarse el ápex y/o en los márgenes laterales de la neoplasia.



**Figura 5:** Positividad para CXCL12. (A) Positividad intensa en células de morfología fusiforme (magnificación original 560x) (B) Positividad intensa en células de morfología epitelioides (magnificación original 560x). (C) Positividad intensa de distribución difusa (magnificación original 25x). (D) Positividad intensa de distribución focal (magnificación original 200x). (E) Control de positividad (lengua, magnificación original 100x).



**Figura 6:** Positividad para CXCR4 (A) Positividad de intensidad media en células de morfología fusiforme (magnificación original 560x) (B) Positividad intensa en células de morfología epitelioides (magnificación original 400x). (C) Positividad intensa de distribución difusa (magnificación original 25x). (D) Positividad intensa en área con melanina (magnificación original 100x). (E) Control de positividad (SNC, magnificación original 200x).

### **6.3 EXPRESIÓN DE CXCR4 y CXCL12**

Todos los tumores estudiados (31/31) expresaron el receptor CXCR4. 5 (16%) de ellos fueron clasificados en el Grupo 1<sub>CXCR4</sub> y 26 (84%) en el Grupo 2<sub>CXCR4</sub>.

La quimiocina CXCL12 se expresó en 30 pacientes (97%). Considerando que el único caso que no expresó la molécula pertenece al Grupo 1<sub>CXCL12</sub>, se clasificaron 11 (35%) tumores en el Grupo 1<sub>CXCL12</sub> y 20 (65%) en el Grupo 2<sub>CXCL12</sub> (Tabla 7).

		Inmunoreactividad		Total
		Si	No	
CXCR4	Grupo 1	5	0	5 (16%)
	Grupo 2	26	0	26 (84%)
	TOTAL	31 (100%)	0 (0%)	31
CXCL12	Grupo 1	10	1	11 (35%)
	Grupo 2	20	0	20 (65%)
	TOTAL	30 (97%)	1 (3%)	31

**Tabla 7:** Inmunorreactividad de CXCR4 y CXCL12

*Grupo 1:* menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

*Grupo 2:* el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

### **6.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 y CXCL12**

19 tumores mostraron una expresividad en el 40% o más de sus células (Grupo 2) tanto del receptor CXCR4 (73%) como de la quimiocina CXCL12 (95%). En cambio sólo 4 especímenes coincidieron en una expresión menor del 40% de sus células neoplásicas (Grupo 1) para la quimiocina CXCL12 (36%) y su receptor CXCR4 (40%).

		CXCL12		Total
		Grupo 1	Grupo 2	
CXCR4	Grupo 1	4	1	5
	Grupo 2	7	19	26
	TOTAL	11	20	31

**Tabla 8 :** Correlación inmunorreactividad CXCR4 y CXCL12

Grupo 1: menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 2: el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

### **6.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN CXCR4 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS**

En el estudio del receptor CXCR4, todas las personas (100%) que desarrollaron metástasis pertenecían al Grupo 2<sub>CXCR4</sub>. De los 17 pacientes que no tuvieron metástasis, 5 (30%) correspondían al Grupo 1<sub>CXCR4</sub> y 12 (70%) al Grupo 2<sub>CXCR4</sub>. Por otro lado, de los 5 pacientes pertenecientes al Grupo 1<sub>CXCR4</sub>, ninguno desarrolló metástasis durante el estudio. En cuanto a los 26 pacientes del Grupo 2<sub>CXCR4</sub>, 14 (54%) desarrollaron metástasis en algún momento y 12 (46%) no lo hicieron (Tabla 9).

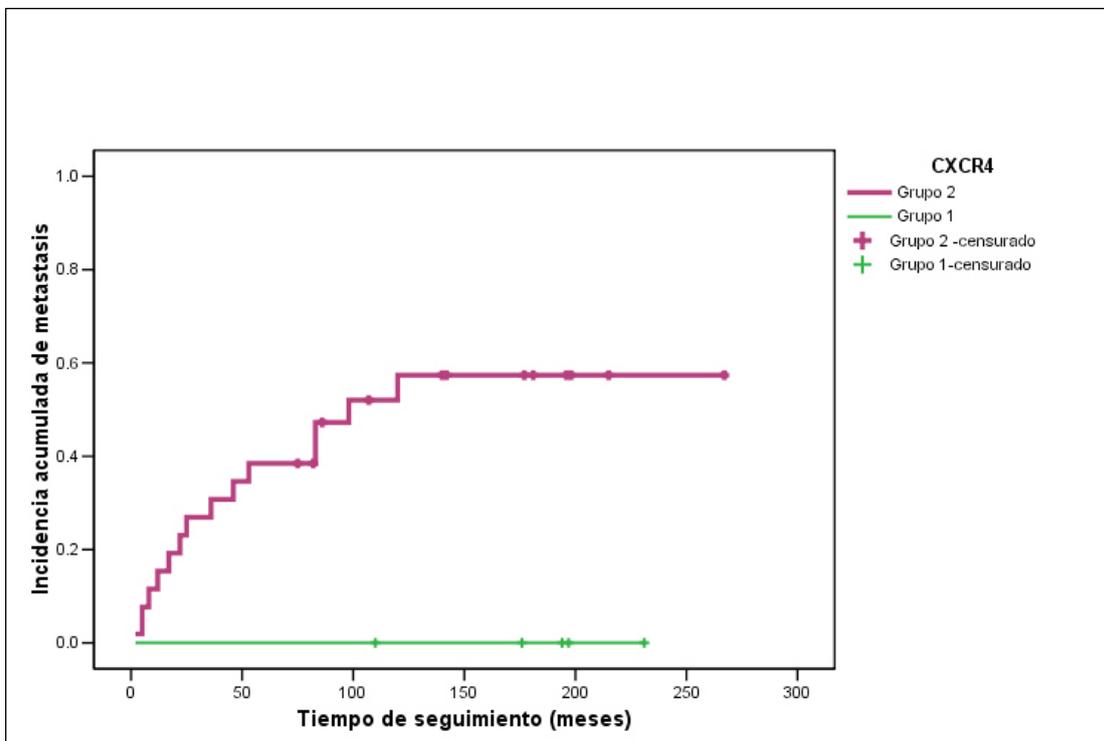
		Metástasis		Total
		Si	No	
CXCR4	Grupo 1	0	5	5
	Grupo 2	14	12	26
	TOTAL	14	17	31

**Tabla 9 :** Frecuencia de metástasis de acuerdo con la expresión de CXCR4

Grupo 1: menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 2: el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

En la figura 7, podemos observar las curvas de incidencia acumulada de metástasis para los 2 grupos de expresión de CXCR4, calculadas mediante la estimación de Kaplan-Meier. Estas revelaron que, mientras en el Grupo 1<sub>CXCR4</sub> ningún paciente desarrolló metástasis durante el seguimiento, en el Grupo 2<sub>CXCR4</sub>, un 23% de los pacientes desarrollaron metástasis a los 2 años, un 38% a los 5 años y un 57% a los 10 años. La diferencia entre ambas curvas fue estadísticamente significativa (Test Log-Rank,  $p < 0,05$ ).



**Figura 7:** Curvas de incidencia acumulada de metástasis de los grupos 1 y 2 de expresión de CXCR4

Grupo 1: menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 2: el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 1-censurado: paciente del Grupo 1 que abandona el estudio antes de finalizar el tiempo de seguimiento o de producirse la aparición de metástasis

Grupo 2-censurado: paciente del Grupo 2 que abandona el estudio antes de finalizar el tiempo de seguimiento o de producirse la aparición de metástasis

## **6.6 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCL12 Y LA PRESENCIA DE METÁSTASIS**

En el estudio de la quimiocina CXCL12, de las 14 personas con enfermedad metastásica, 2 (14%) pertenecían al Grupo 1<sub>CXCL12</sub> y 12 (86%) al Grupo 2<sub>CXCL12</sub>. De los 17 pacientes sin metástasis, 9 (53%) correspondían al Grupo 1<sub>CXCL12</sub> y 8 (47%) al Grupo 2<sub>CXCL12</sub>.

Por otro lado, de los 11 pacientes del Grupo 1<sub>CXCL12</sub>, 2 (18%) desarrollaron metástasis en algún momento del estudio, mientras que 9 (82%) no lo hicieron. En cuanto a los 20 pacientes del Grupo 2<sub>CXCL12</sub>, 12 (60%) desarrollaron metástasis y 8 (40%) no lo hicieron (Tabla 10).

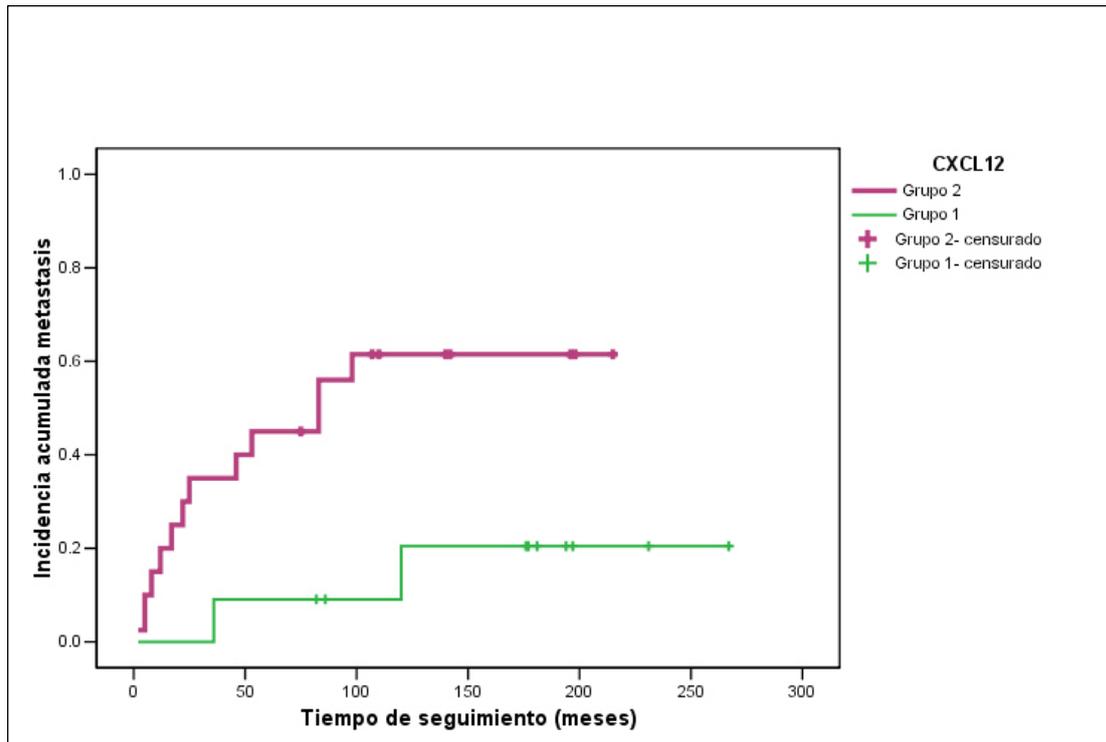
		Metástasis		Total
		Si	No	
CXCL12	Grupo 1	2	9	11
	Grupo 2	12	8	20
	TOTAL	14	17	31

**Tabla 10:** Frecuencia de metástasis de acuerdo con la expresión de CXCL12

Grupo 1: menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 2: el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

En la figura 8, podemos observar como que la incidencia acumulada de metástasis fue en el Grupo 1<sub>CXCL12</sub> de 0% a los 2 años, 10% a los 5 años y 21% a los 10 años. Mientras que en el Grupo 2<sub>CXCL12</sub> los valores observados fueron de 30% a los 2 años, 45% a los 5 años y un máximo de 61% a los 10 años de seguimiento. Las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas (Test de Log Rank,  $p < 0,05$ ).



**Figura 8 :** Curvas de incidencia acumulada de metástasis de los grupos 1 y 2 de expresión de CXCL12.

*Grupo 1:* menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

*Grupo 2:* el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

*Grupo 1-censurado:* paciente del Grupo 1 que abandona el estudio antes de finalizar el tiempo de seguimiento o de producirse la aparición de metástasis

*Grupo 2-censurado:* paciente del Grupo 2 que abandona el estudio antes de finalizar el tiempo de seguimiento o de producirse la aparición de metástasis

## **6.7 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 Y CXCL12 Y LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

Para saber si los parámetros clínico-patológicos podían influir de forma aislada sobre el grado de expresión de las moléculas, se llevaron a cabo una serie de cálculos para estudiar su relación de forma separada con los grupos 1 y 2 de CXCR4 y CXCL12. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 11 y 12.

Como se puede observar ninguno de los parámetros estudiados mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos 1 y 2. Es decir que ni la edad, sexo, tipo celular, diámetro tumoral, ILT o CVC pueden explicar las

diferencias halladas entre los grupos 1 y 2 de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4.

		Grupo 1	Grupo 2	Valor p	Prueba realizada
CXCR4	Edad al diagnóstico (años, media)	56.86	62.35	0.321	t de Student
	Sexo (N)				
	Hombres	4	14	0.278	Chi Cuadrado
	Mujeres	1	12		
	Tipo celular (N)				
	Fusiforme	1	4	0.96	Chi Cuadrado
	Mixto	4	21		
	DBT (mm, media)	12.00	14.78	0.21	t de Student
ILT (N)					
si	1	7	0.935	Chi Cuadrado	
no	4	19			
CVC (N)					
si	1	5	0.788	Chi Cuadrado	
no	4	21			

**Tabla 11:** Estudio de la asociación entre la expresión de CXCR4 y los parámetros clínico-patológicos. ILT: Infiltración linfocítica tumoral, CVC: círculos vasculares cerrados, DBT: Diámetro basal tumoral

Grupo 1: menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 2: el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

		Grupo 1	Grupo 2	Valor p	Prueba realizada
CXCL12	Edad al diagnóstico (años, media)	58.91	62.85	0.354	t de Student
	Sexo (N)				
	Hombres	7	11	0.641	Chi Cuadrado
	Mujeres	4	9		
	Tipo celular (N)				
	Fusiforme	3	3	0.408	Chi Cuadrado
	Mixto	8	17		
DBT (mm, media)	12.41	15.31	0.08	t de Student	
ILT (N)					
si	2	6	0.559	Chi Cuadrado	
no	9	14			
CVC (N)					
si	2	4	1.00	Chi Cuadrado	
no	9	16			

**Tabla 12:** Estudio de la asociación entre la expresión de CXCL12 y los parámetros clínico-patológicos. ILT: Infiltración linfocítica tumoral, CVC: círculos vasculares cerrados, DBT: Diámetro basal tumoral

Grupo 1: menos del 40% de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

Grupo 2: el 40% o más de las células tumorales del melanoma fueron inmunorreactivas

## **7. DISCUSIÓN**

---

En la presente tesis doctoral examinamos por primera vez la expresión inmunohistoquímica de la quimiocina CXCL12, también llamada *stromal-derived factor-1 alpha (SDF1- $\alpha$ )*, y su receptor CXCR4 en especímenes de melanomas malignos de úvea sugiriendo la posibilidad de que, al igual que en otras neoplasias, las células melanocíticas malignas estén utilizando la unión quimiocina-receptor para su supervivencia y diseminación.

El análisis descriptivo de los casos seleccionados muestra como la totalidad de los tumores estudiados se localizaron en la coroides, capa uveal donde crecen hasta el 90% de los melanomas de úvea (Damato 2004). Al igual que se ha descrito en otras publicaciones se observó en este trabajo cierta predominancia del sexo masculino (58%) con respecto al femenino (42%) entre los pacientes afectados (Egan, Seddon y col. 1988). La edad del diagnóstico osciló entre 41 y 81 años, con una media de 60,4 años. Estos datos reflejan que la mayoría de los tumores de nuestra muestra fueron diagnosticados en pacientes de 50 a 70 años, franja de edad en la que se identifican el 70% de los melanomas malignos de úvea (Lorigan, Wallace y col. 1991). Existen varios factores clínico-patológicos descritos en el melanoma maligno de úvea que conllevan un peor pronóstico por su asociación con la aparición de metástasis y una menor supervivencia (Singh, Shields y col. 2001). Entre ellos, los dos más importantes son el tamaño del tumor y el tipo de célula que lo constituye. Si analizamos el tamaño tumoral de la muestra seleccionada el diámetro basal medio fue de 13,6 mm (rango 5-24). Según la clasificación del COMS, este tamaño corresponde a melanomas de coroides medianos cuya mortalidad se sitúa en del 32% a los 5 años (Diener-West, Hawkins y col. 1992). Histológicamente, hasta un 80% de los casos estudiados fueron tumores mixtos compuestos por células epitelioides y fusiformes. Los melanomas uveales mixtos constituyen el tipo más frecuente y su pronóstico es considerado como “intermedio”, por detrás de los tumores epitelioides que corresponden a los más agresivos y delante de los fusiformes que son los de mejor pronóstico (McLean, Foster y col. 1982). Puede sorprender que hasta un 26% de los tumores estudiados presenten una infiltración linfocitaria si lo comparamos con los resultados de otros trabajos donde dicha cifra varía del 5 al 12% (Durie, Campbell y col. 1990). Esto seguramente es debido a que en nuestro estudio se consideró como positivo la presencia de 20 linfocitos o más (difusos

o aislados) mientras que los demás autores consideraron como positivos los tumores con 100 o más linfocitos por 20 campos de gran aumento. Nuestro criterio de selección se basó en que todavía no existe un consenso establecido en el número de linfocitos que debe poseer un melanoma maligno de úvea para considerarlo ILT positivo. En cuanto a los CVC, el 19% de los tumores estudiados presentaron este patrón microvascular. En la literatura, la prevalencia de CVC varía mucho de un estudio a otro en función de la técnica de tinción PAS utilizada (Kivela, Makitie y col. 2004). Nuestra serie puede compararse a la publicada por McLean y col donde el 24% de los tumores presentaron CVC o redes microvasculares (McLean, Keefe y col. 1997). En ambas, a diferencia de la técnica “Gold Standard” para la identificación de los patrones microvasculares, se utilizó la contratinción con hematoxilina y no se consideró necesario llevar a cabo el blanqueamiento de la melanina. A pesar de que se ha publicado que cualquier desviación de la técnica “Gold Standard” puede subestimar el número de CVC tumorales (Kivela, Makitie y col. 2004), este es el procedimiento utilizado en nuestro laboratorio para el estudio de los CVC en los melanomas de úvea con buenos resultados. Hasta casi la mitad de los pacientes estudiados (48%) recibieron tratamiento radioterápico previo a la enucleación. En general, la braquiterapia está indicada de entrada en tumores medianos y la enucleación se reserva para tumores grandes. El alto índice de enucleaciones (52%) como primera opción terapéutica en la muestra estudiada, donde el tamaño tumoral medio corresponde a neoplasias medianas, es debido seguramente a que durante muchos años la enucleación fue el único tratamiento del melanoma maligno de úvea. En el 45% de los pacientes estudiados se produjo una diseminación metastásica creándose nuevos focos tumorales a nivel del hígado, pulmón y hueso. Estos tres órganos corresponden a las localizaciones metastásicas más frecuentes en el melanoma de úvea. Como era de esperar el hígado fue el órgano en el que la incidencia de metástasis fue la más elevada, seguido por el pulmón y el hueso. En algunos pacientes (21%) se identificaron metástasis en varias localizaciones.

La inmunohistoquímica ha demostrado ser una técnica muy valiosa no sólo en el diagnóstico diferencial pero también en el campo de la investigación del melanoma maligno de úvea (Burnier, McLean y col. 1991). Gracias a ella se han podido identificar y estudiar un gran número de factores moleculares implicados en el comportamiento biológico del tumor como son el receptor del factor de crecimiento epidermal, las

moléculas de adhesión ICAM-1 o VCAM-1, la ciclooxigenasa-2, las citoqueratinas o el factor de crecimiento vascular endotelial (Saraiva, Edelstein y col. 2004). Además el estudio inmunohistoquímico del antígeno CXCR4 ha dado excelentes resultados en muestras tisulares de tumores como el de pulmón o mama (Kato, Kitayama y col. 2003; Spano, Andre y col. 2004), y el de la quimiocina CXCL12 en el cancer de ovario (Scotton, Wilson y col. 2002). Por ello, se consideró que la inmunohistoquímica sería la técnica más adecuada para estudiar la expresión del receptor y su ligando en el melanoma maligno de coroides. Se eligieron anticuerpos monoclonales anti-CXCL12 y CXCR4 porque este tipo de anticuerpo reconoce un único epítipo asegurando una elevada especificidad. La clasificación de la inmunoexpresión de ambas moléculas en dos grupos según el porcentaje de células positivas resultó ser adecuado y de fácil manejo. No se ha encontrado un esquema de clasificación similar en otros estudios donde se suele utilizar la intensidad de la expresión inmunohistoquímica (Sun, Wang y col. 2003; Scala, Ottaiano y col. 2005).

Las quimiocinas constituyen un grupo de moléculas de bajo peso molecular con propiedades quimioatrayentes implicadas en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos. Se ha visto que en muchas de neoplasias existe un entramado de quimiocinas y sus receptores cuya producción, expresión y señalización se encuentra alterada (Vicari y Caux 2002). La quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 son un ejemplo de ello. La interacción entre ambas proteínas desencadena diversas funciones biológicas dentro del proceso cancerígeno, tanto a nivel del tumor primario como en la cascada metastásica.

Todos los melanomas de coroides del estudio (31/31) expresaron el receptor de quimiocina CXCR4. Su ligando, la quimiocina CXCL12, también apareció expresado en la mayoría de los casos (30/31). Además en 23 tumores se observó una similitud en el grado de expresión de ambas moléculas. En efecto, 19 casos inmunoexpresaban el receptor y su quimiocina en más del 40% de sus células (Grupo 2) y 4 casos lo hacían en menos del 40% de sus células (Grupo 1). Estos datos sugieren que la interacción quimiocina-receptor podría estar jugando un papel relevante en la progresión biológica del melanoma de coroides primario.

Los resultados de la inmunexpresión de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en otros tumores muestran en algunos casos similitud con nuestro estudio. En efecto, la expresión del receptor CXCR4 fue positiva en todos los especímenes analizados de cáncer de pulmón (Spano, Andre y col. 2004), mama (Kato, Kitayama y col. 2003), glioblastoma y meduloblastoma (Rubin, Kung y col. 2003). En cambio en el melanoma cutáneo sólo el 43% de los casos estudiados fueron positivos (Scala, Ottaiano y col. 2005) y en el cáncer de páncreas el 71% (Koshiba, Hosotani y col. 2000). En cuanto a la quimiocina CXCL12, su expresión inmunohistoquímica en neoplasias malignas de ovario fue positiva en el 100% de los casos (Scotton, Wilson y col. 2002).

A pesar de que las quimiocinas actúan como un factor de protección ante las inflamaciones, se ha visto que en los procesos tumorales su producción exagerada fomenta la supervivencia de las células neoplásicas actuando en varias de las etapas del proceso tumoral (Balkwill 2003). La primera de estas etapas es la proliferación celular a nivel del foco tumoral primario. Diversas investigaciones han mostrado como el complejo CXCR4/CXCL12 es capaz de estimular la proliferación celular *in vivo* y/o *in vitro* de diversos tipos de neoplasias como el cáncer de próstata, ovario, melanoma cutáneo, glioblastoma y mieloma múltiple (Hideshima, Chauhan y col. 2002; Murakami, Maki y col. 2002; Zhou, Larsen y col. 2002; Sun, Wang y col. 2003). Se ha visto que, bajo la influencia de numerosas moléculas del microambiente tumoral, las células neoplásicas incrementan la expresión del receptor de quimiocina CXCR4 e inician la síntesis y secreción de la quimiocina CXCL12. Esta última puede actuar de forma autocrina como factor de crecimiento estimulando la proliferación celular mediante la activación de diversas vías de señalización (MAPK, PI3-Kinasa, ERK) (Darash-Yahana, Pikarsky y col. 2004) y de forma indirecta potenciando la angiogénesis tumoral (Salcedo y Oppenheim 2003). Teniendo en cuenta estas consideraciones, la positividad detectada en este estudio en la expresión del receptor CXCR4 y su quimiocina en el melanoma maligno de úvea sugiere que la interacción entre ambas moléculas podría ser determinante para el crecimiento local del tumor primario. Este hecho relacionaría directamente el complejo CXCR4/CXCL12 con el tamaño tumoral, principal factor de mal pronóstico clínico del melanoma maligno de úvea.

En nuestro estudio, la inmunorreactividad del receptor CXCR4 y su quimiocina CXCL12 fue en todos los casos moderada-intensa, intracitoplasmática y con tendencia a localizarse en las zonas de mayor actividad celular como el ápex y márgenes tumorales. La misma localización citoplasmática del receptor CXCR4 se ha descrito en el cáncer de mama (Kato, Kitayama y col. 2003), pulmón (Spano, Andre y col. 2004), colon (Jordan, Kolios y col. 1999), próstata (Mochizuki, Matsubara y col. 2004), páncreas (Koshiba, Hosotani y col. 2000), melanoma cutáneo (Scala, Ottaiano y col. 2005) y en las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> (Zhang, Foudi y col. 2004). Parece ser que la presencia del receptor a nivel citoplasmático traduce su estado activo y funcionante. El CXCR4 es un receptor de siete dominios transmembrana acoplados a una proteína G que únicamente aparece expresado en la superficie celular bajo determinados estímulos (Scala, Ottaiano y col. 2005). La unión selectiva del receptor CXCR4 con su único ligando, la quimiocina CXCL12, induce su internalización y activa el envío de señales intracelulares. La transducción de estas señales deriva en acciones diferentes y específicas dependiendo del tipo de célula que expresa el receptor y del momento en que es expresado (Roland, Murphy y col. 2003).

No se encontró ninguna diferencia en la inmunoexpresión del CXCR4 y su ligando entre las células fusiformes y epitelioides de los tumores. A pesar de considerarse las células epitelioides como más agresivas (McLean, Foster y col. 1983), ambos tipos de células expresaron las moléculas de forma similar.

El nivel de expresión de ambas moléculas es un dato importante a tener en cuenta en nuestro estudio. El número de tumores en que la expresión del receptor o la quimiocina afecta a gran parte de sus células es elevado. En efecto, la expresión del receptor CXCR4 y la quimocina CXCL12 se manifestó en más del 40% de las células tumorales en el 84% y 65% de los casos respectivamente. En el melanoma maligno de úvea este elevado índice de expresión celular del CXCR4 y su quimiocina podría traducir una mayor agresividad tumoral y ser un indicador de que el tumor va a expandirse.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio con respecto al receptor CXCR4 reflejan como todos los pacientes (100%) que desarrollaron metástasis pertenecían al Grupo 2<sub>CXCR4</sub>, es decir expresaron el receptor en más del 40% de sus células. Si a esto le

sumamos que, más de la mitad de los pacientes del Grupo 2<sub>CXCR4</sub> desarrollaron alguna metástasis durante el seguimiento, podemos considerar que el grado de expresión del receptor de quimiocina CXCR4 es un factor de riesgo relacionado con la diseminación metastásica del melanoma maligno de coroides. Además se comprobó como ningún paciente del Grupo 1<sub>CXCR4</sub> desarrolló focos secundarios metastásicos, es decir, que a menor expresión del receptor en el tumor primario, menor es el riesgo de extensión de la enfermedad.

Algo similar pasa con la quimiocina CXCL12, donde el 86% de los pacientes con metástasis pertenecían al Grupo 2<sub>CXCL12</sub>, el 60% de los pacientes del Grupo 2<sub>CXCL12</sub> desarrollaron metástasis durante el seguimiento y el 82% de los pacientes del Grupo 1<sub>CXCL12</sub> no tuvieron diseminación metastásica. Así podemos decir que el nivel de expresión de la quimiocina CXCL12 también es un indicador de mal pronóstico en el melanoma maligno de coroides.

Las curvas de incidencia acumulada de metástasis refuerzan estas apreciaciones al mostrar claramente como la probabilidad de desarrollar metástasis en el tiempo es en todo momento muy superior en el Grupo 2 que en el Grupo 1, siendo esta diferencia estadísticamente significativa tanto para la quimiocina CXCL12 como para su receptor CXCR4.

Las metástasis, diseminación y crecimiento de las células tumorales en órganos distantes, representan el aspecto más peligroso y devastador en el melanoma de úvea. A pesar de los avances en el diagnóstico, técnicas quirúrgicas y terapias adyuvantes, la aparición de metástasis sigue siendo la principal causa de muerte en los pacientes con melanoma de úvea. Hasta un 50% de los pacientes morirán a los 10 años del diagnóstico inicial debido a la aparición de metástasis, principalmente en el hígado. Como ya se ha comentado, a lo largo de las últimas décadas se han identificado varios parámetros pronósticos metastásicos, clínicos e histopatológicos, entre los que cabe destacar el tamaño tumoral y el tipo celular. Actualmente, las investigaciones se centran en el análisis de las alteraciones genéticas y moleculares que puedan estar asociadas al desarrollo de metástasis en melanoma de úvea y permitan establecer de forma precoz

los genotipos-fenotipos más agresivos así como desarrollar nuevas alternativas terapéuticas.

Las metástasis son un fenómeno muy complejo formado por una serie de pasos secuenciales e interrelacionados. Estos engloban la multiplicación celular, angiogénesis, intravasación, embolización o migración, extravasación y el inicio de una nueva proliferación (Woodhouse, Chuaqui y col. 1997). Únicamente si cada uno de ellos se culmina con éxito, el proceso metastásico será eficiente y tendrá lugar la creación de tumores secundarios (Weiss 1990). Antes se ha comentado su participación en la proliferación celular, pero también se ha visto como el complejo CXCL12/CXCR4 está implicado en otras de estas etapas.

La migración de las células tumorales desde su localización primaria hasta el órgano secundario es considerada por los expertos como una pieza clave del cáncer. Algunos estudios, apoyando la teoría de Ewing (Ewing 1928), han demostrado que en determinados tumores o estadios avanzados de la enfermedad, las células malignas metastásicas quedan atrapadas en los capilares de los órganos debido a la diferencia existente entre el tamaño celular y la luz vascular. Para muchos autores, este hecho marca el inicio de la adhesión, invasión y proliferación y determina la habilidad metastásica de las células tumorales (Ito, Nakanishi y col. 2001). Pero en la mayoría de los tumores, la selección del órgano metastásico se considera un fenómeno no randomizado en donde las células neoplásicas con potencial metastático, que abandonan el tumor primario y logran sobrevivir al sistema inmune y al torrente circulatorio, van a dirigirse e invadir órganos secundarios específicos para cada tumor. Es el caso del melanoma de úvea, donde las células melanocíticas malignas poseen una afinidad especial para metastatizar en el hígado, en particular, hueso y pulmón (Missotten y Keunen 2004).

Se ha visto que esta migración específica o “homing” de las células tumorales está determinada por factores genéticos y moleculares. Por un lado, por las características de un grupo de genes de las células tumorales que han ido mutando a lo largo tiempo o “tool-box” (Minn, Kang y col. 2005), y por otro, por la presencia de factores de crecimiento y/o quimiotácticos en los tejidos metastáticos dianas . Se han identificado

alteraciones en la producción y expresión tumoral de moléculas que participan en la migración celular, como las quimiocinas y sus receptores. Las quimiocinas son conocidas por sus propiedades quimiotácticas al dirigir el tráfico leucocitario y la migración de las stem cells hematopoyéticas hacia lugares anatómicos específicos (Campbell y Butcher 2000). Varios estudios sugieren que este mismo mecanismo es el utilizado por las células malignas circulantes para diseminarse (Moore 2001). Apoyando esta teoría se ha observado como un gran número de quimiocinas aparecen expresadas de forma característica y en concentraciones elevadas en los órganos secundarios, creando un gradiente de concentración que facilitará la migración celular (Balkwill 2003). En el caso de la quimiocina CXCL12, los órganos distantes en los que se han demostrado niveles elevados son el hígado, hueso y pulmón (Spano, Andre y col. 2004). Estas tres localizaciones coinciden con las principales localizaciones metastásicas de las células malignas del melanoma de úvea y por lo tanto el eje molecular CXCL12-CXCR4 podría tener un papel importante en la especificidad metastásica de dicho tumor.

La presencia de la quimiocina CXCL12 en los melanomas de coroides estudiados puede ser debida a la secreción autocrina por las mismas células tumorales y paracrina por las células del microambiente tumoral, pero también provenir del hígado, pulmón, hueso y otras localizaciones frecuentes de las metástasis en estos pacientes. Estos órganos secretarían la quimiocina para atraer a las células tumorales con poder metastático hacia ellos apoyando la teoría que las metástasis en el melanoma de úvea no son un fenómeno aleatorio sino dependiente de determinados factores entre los que se encuentra el eje CXCL12/CXCR4.

Basándonos en las mismas propiedades que explican el fenómeno del homing, otra consideración a tener en cuenta es la posible participación de la interacción quimiocina CXCL12 y su receptor en la localización de posibles focos de micrometástasis responsables de la producción y liberación de células circulantes malignas (CMC). Un ensayo clínico realizado en nuestro centro acaba de demostrar la presencia de CMC en sangre en todos los pacientes con melanoma de úvea independientemente del tipo de tratamiento aplicado o el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la realización del estudio. Estos datos sugieren primero, que la diseminación sanguínea de células

malignas se produce en estadios muy precoces de la enfermedad y segundo, que existen focos neoplásicos no detectables, y seguramente en “estado durmiente”, que liberan células neoplásicas al torrente sanguíneo. El estudio de la quimiocina CXCL12 y su receptor en las CMC podría aportar información valiosa para demostrar esta última hipótesis al ayudar a rastrear los posibles focos “durmientes”.

No queda claro si la misma subpoblación de células que expresa el CXCR4 en el melanoma de úvea primario es la que va a diseminar, sobrevivir y migrar para formar depósitos metastáticos distantes. Por un lado no todos los tumores del estudio que expresaron las moléculas finalizaron con metástasis y por otro, diversos estudios clínicos y experimentales, han demostrado que las neoplasias están sujetas a una serie de cambios a lo largo del tiempo que pueden modificar las propiedades de las células detectadas en el tumor primario. Se definió como “progresión neoplásica” a la adquisición de cambios permanentes, irreversibles y cualitativos en una o más características de las células tumorales. Esta evolución es gradual y explica porque el comportamiento del tumor puede variar en los diferentes estadios de la enfermedad. En nuestro caso, es necesario realizar más estudios para comprobar si la expresión de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 cambia a medida que la enfermedad avanza en el tiempo.

Por último, en este trabajo se ha visto como ninguno de los parámetros clínico patológicos estudiados ha demostrado tener una influencia estadísticamente significativa en el grado de expresión del receptor CXCR4 y su quimiocina CXCL12. Es decir, tanto la edad al diagnóstico como el mayor diámetro tumoral, sexo, tipo celular y presencia de ILT y CVC fueron semejantes entre los grupos 1 y 2 de las moléculas CXCR4 y CXCL12. Todos estos factores implican un peor pronóstico en los pacientes con melanoma maligno de úvea y su presencia podría estar alterando los resultados del estudio. El hecho de que ninguno de ellos pueda explicar las diferencias encontradas entre los grupos 1 y 2 apoya la idea que la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 pueden ser considerados como factores pronósticos independientes del melanoma maligno de úvea.

## **8. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

---

Una vez conocida la presencia de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en el melanoma maligno de úvea y haber establecido una relación entre su nivel de expresión y un peor pronóstico clínico es necesario seguir con esta línea de investigación. A continuación se exponen cuales son los pasos que se deberían llevar a cabo para completar este estudio.

1. Reunir una muestra mayor de casos con un poder estadístico suficiente que sea capaz de definir mejor la influencia pronóstica de la quimiocina CXCL12 y su receptor en el melanoma maligno de úvea y poder así sugerir su incorporación en la descripción anatomopatológica de estos tumores.
2. Establecer la contribución molecular del complejo CXCL12/CXCR4 en el proceso biológico del melanoma maligno de úvea. Para ello es imprescindible determinar si, al igual que en otros tumores, la interacción entre la quimiocina y el receptor influye positivamente en la proliferación, migración, adhesión endotelial y la invasión tisular (Taichman, Cooper y col. 2002; Zhou, Larsen y col. 2002; Smith, Luker y col. 2004). Para ello sería conveniente realizar *in vitro* ensayos de proliferación, migración o quimiotaxis, quimioinvasión y adhesión utilizando líneas celulares de melanoma de úvea (Marshall, Caissie y col. 2004).
3. Probar la actividad de los inhibidores del CXCR4 y/o CXCL12 *in vitro* e *in vivo*. Esto último se haría con un modelo animal de conejos albinos inmunodeprimidos con ciclosporina A a los que se les inyectaría una línea celular de melanoma de úvea en el espacio coroideo (Ordonez, Saornil y col. 2002; Blanco, Marshall y col. 2005). Se mediría entonces la progresión biológica del tumor en presencia o ausencia de anticuerpos antiCXCL12 o antiCXCR4.

## **9. CONCLUSIONES**

---

1. La casi totalidad de los melanomas malignos de coroides estudiados expresaron la quimiocina CXCL12 y todos ellos expresaron el receptor de quimiocina CXCR4. El patrón de tinción inmunohistoquímico fue para ambas moléculas intracitoplasmático de intensidad moderada-alta.
2. La presencia de metástasis de los pacientes con melanoma maligno de úvea está correlacionada con los niveles de expresión de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4.
3. La expresión de CXCL12 y CXCR4 no está relacionada con otras variables clínico-patológicas de mal pronóstico conocidas. La quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 pueden ser considerados indicadores pronósticos independientes.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

---

- Arai, J., M. Yasukawa, y col. (2000). "Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1." Eur J Haematol **64**(5): 323-32.
- Arenberg, D. A., P. J. Polverini, y col. (1997). "The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer." J Leukoc Biol **62**(5): 554-62.
- Augsburger, J. J., R. G. Peyster, y col. (1987). "Computed tomography of posterior uveal melanomas." Arch Ophthalmol **105**(11): 1512-6.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-8.
- Balkwill, F. (2003). "Chemokine biology in cancer." Semin Immunol **15**(1): 49-55.
- Bedikian, A. Y., S. S. Legha, y col. (1995). "Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver: a review of the M. D. Anderson Cancer Center experience and prognostic factors." Cancer **76**(9): 1665-70.
- Benovic, J. L. y A. Marchese (2004). "A new key in breast cancer metastasis." Cancer Cell **6**(5): 429-30.
- Berg, D. J., N. Davidson, y col. (1996). "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses." J Clin Invest **98**(4): 1010-20.
- Blanco, P. L., J. C. Marshall, y col. (2005). "Characterization of ocular and metastatic uveal melanoma in an animal model." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(12): 4376-82.
- Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, y col. (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." J Exp Med **184**(3): 1101-9.

- Bornfeld, N., S. Talies, y col. (2002). "[Endoscopic resection of malignant melanomas of the uvea after preoperative stereotactic single dose convergence irradiation with the Leksell gamma knife]." Ophthalmologie **99**(5): 338-44.
- Broadway, D., S. Lang, y col. (1991). "Congenital malignant melanoma of the eye." Cancer **67**(10): 2642-52.
- Burger, J. A., M. Burger, y col. (1999). "Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells." Blood **94**(11): 3658-67.
- Burger, M., A. Glodek, y col. (2003). "Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells." Oncogene **22**(50): 8093-101.
- Burnier, M. N., Jr., I. W. McLean, y col. (1991). "Immunohistochemical evaluation of uveal melanocytic tumors. Expression of HMB-45, S-100 protein, and neuron-specific enolase." Cancer **68**(4): 809-14.
- Callender, G. (1931). "Malignant melanotic tumors of the eye: a study fo histologic types in 111 cases." Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol(36): 131-42.
- Cameron, M. D., E. E. Schmidt, y col. (2000). "Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency." Cancer Res **60**(9): 2541-6.
- Caminal Mitjana, J. M., M. Quintana Casany, y col. (2002). "[Results of Iodine-125 radiotherapy in the treatment of uveal melanoma]." Arch Soc Esp Oftalmol **77**(1): 29-38.
- Campbell, J. J. y E. C. Butcher (2000). "Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing." Curr Opin Immunol **12**(3): 336-41.

- Cardones, A. R., T. Murakami, y col. (2003). "CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin." Cancer Res **63**(20): 6751-7.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, y col. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-72.
- Chambers, A. F., I. C. MacDonald, y col. (1995). "Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy." Cancer Metastasis Rev **14**(4): 279-301.
- Chambers, A. F., G. N. Naumov, y col. (2001). "Critical steps in hematogenous metastasis: an overview." Surg Oncol Clin N Am **10**(2): 243-55, vii.
- Chang, A. E., L. H. Karnell, y col. (1998). "The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society." Cancer **83**(8): 1664-78.
- Char, D. H., T. R. Miller, y col. (1989). "Fine needle aspiration biopsy in uveal melanoma." Acta Cytol **33**(5): 599-605.
- Coleman, D. J., R. H. Silverman, y col. (2004). "Noninvasive in vivo detection of prognostic indicators for high-risk uveal melanoma: ultrasound parameter imaging." Ophthalmology **111**(3): 558-64.
- COMS (1990). "Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 1." Arch Ophthalmol **108**(9): 1268-73.
- D'Apuzzo, M., A. Rolink, y col. (1997). "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." Eur J Immunol **27**(7): 1788-93.

- Damato, B. (2001). "Detection of uveal melanoma by optometrists in the United Kingdom." Ophthalmic Physiol Opt **21**(4): 268-71.
- Damato, B. (2004). "Developments in the management of uveal melanoma." Clin Experiment Ophthalmol **32**(6): 639-47.
- Darash-Yahana, M., E. Pikarsky, y col. (2004). "Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis." Faseb J **18**(11): 1240-2.
- Davidorf, F. H. (1981). "The melanoma controversy. A comparison of choroidal, cutaneous, and iris melanomas." Surv Ophthalmol **25**(6): 373-7.
- de la Cruz, P. O., Jr., C. S. Specht, y col. (1990). "Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma." Cancer **65**(1): 112-5.
- De Potter, P., A. E. Flanders, y col. (1993). "Magnetic resonance imaging of intraocular tumors." Int Ophthalmol Clin **33**(3): 37-45.
- Demirci, H., C. L. Shields, y col. (2001). "Bilateral breast metastases from choroidal melanoma." Am J Ophthalmol **131**(4): 521-3.
- Diener-West, M., J. D. Earle, y col. (2001). "The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma, III: initial mortality findings. COMS Report No. 18." Arch Ophthalmol **119**(7): 969-82.
- Diener-West, M., B. S. Hawkins, y col. (1992). "A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988." Arch Ophthalmol **110**(2): 245-50.
- Dithmar, S., C. E. Diaz, y col. (2000). "Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases." Retina **20**(1): 76-9.
- Dithmar, S., H. E. Volcker, y col. (1999). "Multifocal intraocular malignant melanoma: report of two cases and review of the literature." Ophthalmology **106**(7): 1345-8.

- Dolin, P. J., A. J. Foss, y col. (1994). "Uveal melanoma: is solar ultraviolet radiation a risk factor?" Ophthalmic Epidemiol **1**(1): 27-30.
- Durie, F. H., A. M. Campbell, y col. (1990). "Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **31**(10): 2106-10.
- Earle, J. D. (1999). "Results from the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) of enucleation versus preoperative radiation therapy in the management of large ocular melanomas." Int J Radiat Oncol Biol Phys **43**(5): 1168-9.
- Egan, K. M., J. M. Seddon, y col. (1988). "Epidemiologic aspects of uveal melanoma." Surv Ophthalmol **32**(4): 239-51.
- Escalona-Benz, E., M. S. Benz, y col. (2003). "Uveal melanoma presenting as acute angle-closure glaucoma: report of two cases." Am J Ophthalmol **136**(4): 756-8.
- Eskelin, S. y T. Kivela (2002). "Mode of presentation and time to treatment of uveal melanoma in Finland." Br J Ophthalmol **86**(3): 333-8.
- Eskelin, S., S. Pyrhonen, y col. (2000). "Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment." Ophthalmology **107**(8): 1443-9.
- Eskelin, S., S. Pyrhonen, y col. (1999). "Screening for metastatic malignant melanoma of the uvea revisited." Cancer **85**(5): 1151-9.
- Ewing (1928). "Neoplastic Diseases. A Treatise on Tumors." 77-89.
- Fernandis, A. Z., A. Prasad, y col. (2004). "Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells." Oncogene **23**(1): 157-67.
- Fidler, I. J. (1999). "Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy." Cancer Chemother Pharmacol **43 Suppl**: S3-10.
- Folberg, R., M. J. Hendrix, y col. (2000). "Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis." Am J Pathol **156**(2): 361-81.

- Folberg, R., J. Pe'er, y col. (1992). "The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study." Hum Pathol **23**(11): 1298-305.
- Folberg, R., V. Rummelt, y col. (1993). "The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma." Ophthalmology **100**(9): 1389-98.
- Folkman, J. (1992). "The role of angiogenesis in tumor growth." Semin Cancer Biol **3**(2): 65-71.
- Foss, A. J., R. A. Alexander, y col. (1997). "Reassessment of the PAS patterns in uveal melanoma." Br J Ophthalmol **81**(3): 240-6; discussion 247-8.
- Friedman, S. M. y C. E. Margo (1998). "Choroidal melanoma and neurofibromatosis type 1." Arch Ophthalmol **116**(5): 694-5.
- Gallagher, R. P., J. M. Elwood, y col. (1985). "Risk factors for ocular melanoma: Western Canada Melanoma Study." J Natl Cancer Inst **74**(4): 775-8.
- Gamel, J. W., J. B. McCurdy, y col. (1992). "A comparison of prognostic covariates for uveal melanoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(6): 1919-22.
- Ganley, J. P. y G. W. Comstock (1973). "Benign nevi and malignant melanomas of the choroid." Am J Ophthalmol **76**(1): 19-25.
- Garcia-Arumi, J., L. Sararols, y col. (2001). "Vitreoretinal surgery and endoresection in high posterior choroidal melanomas." Retina **21**(5): 445-52.
- García del Moral, R. (1993). Laboratorio de anatomía patológica. Madrid [etc.], Interamericana/McGraw-Hill.
- Geminder, H., O. Sagi-Assif, y col. (2001). "A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma." J Immunol **167**(8): 4747-57.

- Gerard, C. y B. J. Rollins (2001). "Chemokines and disease." Nat Immunol **2**(2): 108-15.
- Gonder, J. R., J. A. Shields, y col. (1982). "Uveal malignant melanoma associated with ocular and oculodermal melanocytosis." Ophthalmology **89**(8): 953-60.
- Greene, M. H., W. H. Clark, Jr., y col. (1985). "High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi." Ann Intern Med **102**(4): 458-65.
- Gunduz, K., C. L. Shields, y col. (1999). "Plaque radiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement." Arch Ophthalmol **117**(2): 170-7.
- Gupta, S. K., P. G. Lysko, y col. (1998). "Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines." J Biol Chem **273**(7): 4282-7.
- Hadfield (1954). "The dormant cancer state." Br Med J(2): 607-609.
- Hale, P. N., R. A. Allen, y col. (1965). "Benign melanomas (nevi) of the choroid and ciliary body." Arch Ophthalmol **74**(4): 532-8.
- Hamada, T., R. Mohle, y col. (1998). "Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation." J Exp Med **188**(3): 539-48.
- Hanna, N. (1982). "Role of natural killer cells in control of cancer metastasis." Cancer Metastasis Rev **1**(1): 45-64.
- Harbour (2004). "Association between posterior uveal melanoma and iris freckles, iris naevi, and choroidal naevi." Br J Ophthalmol **88**(1): 36-8.
- Hicks, C., A. J. Foss, y col. (1998). "Predictive power of screening tests for metastasis in uveal melanoma." Eye **12** ( Pt 6): 945-8.
- Hideshima, T., D. Chauhan, y col. (2002). "The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma." Mol Cancer Ther **1**(7): 539-44.

- Holmgren, L., M. S. O'Reilly, y col. (1995). "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med **1**(2): 149-53.
- Honavar, S. G., A. D. Singh, y col. (2000). "Iris melanoma in a patient with neurofibromatosis." Surv Ophthalmol **45**(3): 231-6.
- Ito, S., H. Nakanishi, y col. (2001). "Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line." Int J Cancer **93**(2): 212-7.
- Jordan, N. J., G. Kolios, y col. (1999). "Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells." J Clin Invest **104**(8): 1061-9.
- Kang, Y., P. M. Siegel, y col. (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." Cancer Cell **3**(6): 537-49.
- Kato, M., J. Kitayama, y col. (2003). "Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma." Breast Cancer Res **5**(5): R144-50.
- Keane, M. P., D. A. Arenberg, y col. (1997). "The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis." J Immunol **159**(3): 1437-43.
- Kivela, T., T. Makitie, y col. (2004). "Microvascular loops and networks in uveal melanoma." Can J Ophthalmol **39**(4): 409-21.
- Koop, S., I. C. MacDonald, y col. (1995). "Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate." Cancer Res **55**(12): 2520-3.

- Koshiba, T., R. Hosotani, y col. (2000). "Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression." Clin Cancer Res **6**(9): 3530-5.
- Kulbe, H., N. R. Levinson, y col. (2004). "The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement." Int J Dev Biol **48**(5-6): 489-96.
- Laning, J., H. Kawasaki, y col. (1994). "Inhibition of in vivo tumor growth by the beta chemokine, TCA3." J Immunol **153**(10): 4625-35.
- Libura, J., J. Drukala, y col. (2002). "CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion." Blood **100**(7): 2597-606.
- Lopez-Caballero, C., M. A. Saornil-Alvarez, y col. (2003). "[Choroidal melanoma in ocular melanosis]." Arch Soc Esp Oftalmol **78**(2): 99-102.
- Lorigan, J. G., S. Wallace, y col. (1991). "The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients." AJR Am J Roentgenol **157**(6): 1279-81.
- Luzzi, K. J., I. C. MacDonald, y col. (1998). "Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases." Am J Pathol **153**(3): 865-73.
- Makitie, T. y T. Kivela (2001). "Cardiac metastasis from uveal melanoma." Chest **120**(6): 2115.
- Maniotis, A. J., X. Chen, y col. (2002). "Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix." Lab Invest **82**(8): 1031-43.

- Maniotis, A. J., R. Folberg, y col. (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." Am J Pathol **155**(3): 739-52.
- Marshall, J. C., A. L. Caissie, y col. (2004). "How in vitro techniques have increased our understanding of uveal melanoma cellular biology." Can J Ophthalmol **39**(4): 428-32.
- Mascaró, F. (1987). Aplicaciones clínicas de la ecografía en oftalmología. Barcelona.
- McCurdy, J., J. Gamel, y col. (1991). "A simple, efficient, and reproducible method for estimating the malignant potential of uveal melanoma from routine H & E slides." Pathol Res Pract **187**(8): 1025-7.
- McLean, I. W., Armed Forces Institute of Pathology (U.S.), y col. (1994). Tumors of the eye and ocular adnexa. Washington, D.C. Bethesda, Md., Armed Forces Institute of Pathology ; under the auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology Inc.
- McLean, I. W., W. D. Foster, y col. (1982). "Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis." Hum Pathol **13**(2): 123-32.
- McLean, I. W., W. D. Foster, y col. (1983). "Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology." Am J Ophthalmol **96**(4): 502-9.
- McLean, I. W., K. S. Keefe, y col. (1997). "Uveal melanoma. Comparison of the prognostic value of fibrovascular loops, mean of the ten largest nucleoli, cell type, and tumor size." Ophthalmology **104**(5): 777-80.
- McLean, M. J., W. D. Foster, y col. (1977). "Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body." Arch Ophthalmol **95**(1): 48-58.

- Midena, E., V. de Belvis, y col. (1999). "Isolated brain metastasis of malignant choroidal melanoma 27 years after enucleation." Arch Ophthalmol **117**(11): 1553-6.
- Miller, B., C. Abrahams, y col. (1981). "Ocular malignant melanoma in South African blacks." Br J Ophthalmol **65**(10): 720-2.
- Minn, A. J., Y. Kang, y col. (2005). "Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors." J Clin Invest **115**(1): 44-55.
- Missotten, G. S. y J. E. Keunen (2004). "Screening for uveal melanoma metastasis. Literature review." Bull Soc Belge Ophtalmol(294): 13-22.
- Mitra, P., K. Shibuta, y col. (1999). "CXCR4 mRNA expression in colon, esophageal and gastric cancers and hepatitis C infected liver." Int J Oncol **14**(5): 917-25.
- Mochizuki, H., A. Matsubara, y col. (2004). "Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis." Biochem Biophys Res Commun **320**(3): 656-63.
- Moore, M. A. (2001). "The role of chemoattraction in cancer metastases." Bioessays **23**(8): 674-6.
- Moser, B. y L. Ebert (2003). "Lymphocyte traffic control by chemokines: follicular B helper T cells." Immunol Lett **85**(2): 105-12.
- Mueller, A. J., D. U. Bartsch, y col. (1998). "Imaging the microvasculature of choroidal melanomas with confocal indocyanine green scanning laser ophthalmoscopy." Arch Ophthalmol **116**(1): 31-9.
- Muller, A., B. Homey, y col. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-6.

- Murakami, T., A. R. Cardones, y col. (2004). "Chemokine receptors and melanoma metastasis." J Dermatol Sci **36**(2): 71-8.
- Murakami, T., W. Maki, y col. (2002). "Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells." Cancer Res **62**(24): 7328-34.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, y col. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.
- Nakashima, E., A. Oya, y col. (1996). "A candidate for cancer gene therapy: MIP-1 alpha gene transfer to an adenocarcinoma cell line reduced tumorigenicity and induced protective immunity in immunocompetent mice." Pharm Res **13**(12): 1896-901.
- Naumov, G. N., I. C. MacDonald, y col. (2002). "Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy." Cancer Res **62**(7): 2162-8.
- Nickoloff, B. J., R. S. Mitra, y col. (1994). "Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis." Am J Pathol **144**(4): 820-8.
- Opdenakker, G. y J. Van Damme (2004). "The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines." Int J Dev Biol **48**(5-6): 519-27.
- Ordonez, J. L., M. A. Saornil, y col. (2002). "The need for continuous immunosuppression with cyclosporin A to maintain an experimental model of uveal melanoma." Melanoma Res **12**(5): 441-7.
- Paget (1889). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast." Lancet: 99-101.

- Patel, B. C., C. A. Egan, y col. (1998). "Cutaneous malignant melanoma and oculodermal melanocytosis (nevus of Ota): report of a case and review of the literature." J Am Acad Dermatol **38**(5 Pt 2): 862-5.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, y col. (2003). "The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases." Am J Respir Crit Care Med **167**(12): 1676-86.
- Raivio, I. (1977). "Uveal melanoma in Finland. An epidemiological, clinical, histological and prognostic study." Acta Ophthalmol Suppl(133): 1-64.
- Rajpal, S., R. Moore, y col. (1983). "Survival in metastatic ocular melanoma." Cancer **52**(2): 334-6.
- Rehany, U. y S. Rumelt (1999). "Iridocorneal melanoma associated with type 1 neurofibromatosis: a clinicopathologic study." Ophthalmology **106**(3): 614-8.
- Rempel, S. A., S. Dudas, y col. (2000). "Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma." Clin Cancer Res **6**(1): 102-11.
- Roland, J., B. J. Murphy, y col. (2003). "Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling." Blood **101**(2): 399-406.
- Rolli, M., E. Fransvea, y col. (2003). "Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9482-7.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- Rossi, D. y A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.

- Rottman, J. B. (1999). "Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease." Vet Pathol **36**(5): 357-67.
- Rubin, J. B., A. L. Kung, y col. (2003). "A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13513-8.
- Rummelt, V., R. Folberg, y col. (1994). "Microcirculation architecture of melanocytic nevi and malignant melanomas of the ciliary body and choroid. A comparative histopathologic and ultrastructural study." Ophthalmology **101**(4): 718-27.
- Rummelt, V., R. Folberg, y col. (1995). "Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas." Ophthalmology **102**(5): 844-51.
- Salcedo, R. y J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." Microcirculation **10**(3-4): 359-70.
- Sanz-Rodriguez, F., A. Hidalgo, y col. (2001). "Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1." Blood **97**(2): 346-51.
- Saornil, M. A. (2004). "Iris colour and uveal melanoma." Can J Ophthalmol **39**(4): 448-52.
- Saraiva, V. S., C. Edelstein, y col. (2004). "New prognostic factors in uveal melanomas: potential molecular targets for therapy." Can J Ophthalmol **39**(4): 422-7.
- Scala, S., A. Ottaiano, y col. (2005). "Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma." Clin Cancer Res **11**(5): 1835-41.

- Schrader, A. J., O. Lechner, y col. (2002). "CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer." Br J Cancer **86**(8): 1250-6.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, y col. (2001). "Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?" Cancer Res **61**(13): 4961-5.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, y col. (2002). "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." Cancer Res **62**(20): 5930-8.
- Seddon, J. M., D. M. Albert, y col. (1983). "A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma." Arch Ophthalmol **101**(12): 1894-9.
- Seddon, J. M., E. S. Gragoudas, y col. (1990). "Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma. A case-control study." Arch Ophthalmol **108**(9): 1274-80.
- Seibert, C. y T. P. Sakmar (2004). "Small-molecule antagonists of CCR5 and CXCR4: a promising new class of anti-HIV-1 drugs." Curr Pharm Des **10**(17): 2041-62.
- Seregard, S., B. Spangberg, y col. (1998). "Prognostic accuracy of the mean of the largest nucleoli, vascular patterns, and PC-10 in posterior uveal melanoma." Ophthalmology **105**(3): 485-91.
- Shammas, H. F. y R. C. Watzke (1977). "Bilateral choroidal melanomas. Case report and incidence." Arch Ophthalmol **95**(4): 617-23.
- Shields, C. L. (1999). "Atlas of Intraocular Tumors." Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 17-42.
- Shields, C. L., J. A. Shields, y col. (1996). "Diffuse choroidal melanoma. Clinical features predictive of metastasis." Arch Ophthalmol **114**(8): 956-63.
- Shields, C. L., J. A. Shields, y col. (2001). "Iris melanoma: risk factors for metastasis in 169 consecutive patients." Ophthalmology **108**(1): 172-8.

- Shields, C. L., J. A. Shields, y col. (2002). "Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: outcomes and limitations." Ophthalmology **109**(2): 225-34.
- Shields, J. A. (2002). "Management of posterior uveal melanoma: past, present, future." Retina **22**(2): 139-42.
- Shimonaka, M., K. Katagiri, y col. (2003). "Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow." J Cell Biol **161**(2): 417-27.
- Simpson, E. R. (2004). "Ciliary body melanoma: a special challenge." Can J Ophthalmol **39**(4): 365-71.
- Singh, A. D., P. De Potter, y col. (1998). "Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo(dermal) melanocytosis." Ophthalmology **105**(1): 195-8.
- Singh, A. D., I. G. Rennie, y col. (2004). "Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma." Surv Ophthalmol **49**(4): 419-28.
- Singh, A. D., C. L. Shields, y col. (2001). "Prognostic factors in uveal melanoma." Melanoma Res **11**(3): 255-63.
- Singh, A. D., C. L. Shields, y col. (2000). "Uveal melanoma in young patients." Arch Ophthalmol **118**(7): 918-23.
- Singh, A. D., J. A. Shields, y col. (2001). "Choroidal melanoma metastatic to the contralateral choroid." Am J Ophthalmol **132**(6): 941-3.
- Singh, A. D. y A. Topham (2003). "Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997." Ophthalmology **110**(5): 956-61.
- Singh, A. D., M. X. Wang, y col. (1996). "Genetic aspects of uveal melanoma: a brief review." Semin Oncol **23**(6): 768-72.

- Smith, M. C., K. E. Luker, y col. (2004). "CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer." Cancer Res **64**(23): 8604-12.
- Spano, J. P., F. Andre, y col. (2004). "Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome." Ann Oncol **15**(4): 613-7.
- Stetler-Stevenson, W. G., S. Aznavoorian, y col. (1993). "Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis." Annu Rev Cell Biol **9**: 541-73.
- Strieter, R. M., J. A. Belperio, y col. (2004). "CXC chemokines in angiogenesis of cancer." Semin Cancer Biol **14**(3): 195-200.
- Strieter, R. M., M. D. Burdick, y col. (2005). "CXC chemokines in angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 593-609.
- Sun, Y. X., J. Wang, y col. (2003). "Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo." J Cell Biochem **89**(3): 462-73.
- Szlosarek, P. W. y F. R. Balkwill (2003). "Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours." Lancet Oncol **4**(9): 565-73.
- Tachibana, K., S. Hirota, y col. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.
- Taichman, R. S., C. Cooper, y col. (2002). "Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone." Cancer Res **62**(6): 1832-7.
- Tarin, D., J. E. Price, y col. (1984). "Clinicopathological observations on metastasis in man studied in patients treated with peritoneovenous shunts." Br Med J (Clin Res Ed) **288**(6419): 749-51.

- Theunissen, P., G. Spincemaille, y col. (1993). "Meningeal melanoma associated with nevus of Ota: case report and review." Clin Neuropathol **12**(3): 125-9.
- Toth-Molnar, E., H. Hammer, y col. (2000). "Cutaneous dysplastic naevi in uveal melanoma patients: markers for prognosis?" Melanoma Res **10**(1): 36-9.
- Toth-Molnar, E., J. Olah, y col. (2004). "Ocular pigmented findings in patients with dysplastic naevus syndrome." Melanoma Res **14**(1): 43-7.
- Tucker, M. A., J. A. Shields, y col. (1985). "Sunlight exposure as risk factor for intraocular malignant melanoma." N Engl J Med **313**(13): 789-92.
- Turner, B. J., R. M. Siatkowski, y col. (1989). "Other cancers in uveal melanoma patients and their families." Am J Ophthalmol **107**(6): 601-8.
- Vajdic, C. M., A. Krickler, y col. (2002). "Sun exposure predicts risk of ocular melanoma in Australia." Int J Cancer **101**(2): 175-82.
- Velazquez, N. y I. S. Jones (1983). "Ocular and oculodermal melanocytosis associated with uveal melanoma." Ophthalmology **90**(12): 1472-6.
- Vicari, A. P. y C. Caux (2002). "Chemokines in cancer." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 143-54.
- Walz, A., P. Schmutz, y col. (1997). "Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease." J Leukoc Biol **62**(5): 604-11.
- Weiss, L. (1990). "Metastatic inefficiency." Adv Cancer Res **54**: 159-211.
- Wheelock, E. F., K. J. Weinhold, y col. (1981). "The tumor dormant state." Adv Cancer Res **34**: 107-40.
- Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, y col. (1997). "General mechanisms of metastasis." Cancer **80**(8 Suppl): 1529-37.
- Youngs, S. J., S. A. Ali, y col. (1997). "Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines." Int J Cancer **71**(2): 257-66.

Zhang, Y., A. Foudi, y col. (2004). "Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells." Stem Cells **22**(6): 1015-29.

Zhou, Y., P. H. Larsen, y col. (2002). "CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival." J Biol Chem **277**(51): 49481-7.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, y col. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.