

Análisis de expresión de PCNA, p53 y bcl-2 en la secuencia melanosis adquirida primaria-melanoma conjuntival

Dr. Luis Fernando Torres-Bernal¹, Dr. José Luis Díaz-Rubio¹, Dra. Patricia Sánchez², Dr. Abelardo Rodríguez-Reyes¹,
Dra. Dolores Ríos y Valles-Valles¹, Dr. Luis Benítez-Bribiesca²

RESUMEN

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

Material y métodos: Se investigó la expresión de las proteínas PCNA, p53 y bcl-2 mediante estudio de inmunohistoquímica en cuatro casos de MAP y cinco casos de melanomas conjuntivales. Se realizó un análisis cuantitativo de las células positivas para los diversos marcadores, presentes en los diversos tejidos de los diferentes casos.

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

Conclusiones: La alteración de las vías de p53 participa de forma importante en el desarrollo de la secuencia MAP-melanoma conjuntival.

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

SUMMARY

Objectives: To analyze the protein expression of PCNA, p53 and bcl-2 in the sequence primary acquired melanosis (PAM)-conjunctival melanoma (CM).

Methods: PCNA, p53, and bcl-2 protein expression was studied by immunohistochemistry in four cases of PAM and five cases of CM. A quantitative analysis was done counting the number of positive cells, present in tissues of the different cases.

Results: We demonstrated a direct relationship between PCNA overexpression and the malignant potential of conjunctival lesions with major overexpression of PCNA in conjunctival melanomas in contrast to PAM cases. The 60% of CM cases presented a positive p53 expression while all PAM, cases were negative. Finally we could not find an overexpression of bcl-2 in all cases.

Conclusion: p53 pathway participate importantly in the development of the sequence PAM -CM.

Keywords: Conjunctival melanoma, primary acquired melanosis, bcl-2, p53, PCNA .

INTRODUCCIÓN

El melanoma conjuntival es un tumor poco frecuente que tiene una alta tasa de recurrencia y una mortalidad de hasta un 30%. De forma interesante el 75% de los melanomas conjuntivales se originan a partir de una melanosis adquirida primaria (MAP). Dentro de los casos de MAP se postula que solo

aquellos con cambios celulares atípicos tiene potencial de transformación maligna (1, 2). Este hecho constituye una base importante para el estudio de los eventos moleculares que acontecen en la transformación de un tumor benigno a uno maligno.

Actualmente una neoplasia puede definirse como una des-regulación de la homeostasis tisular ocasionada por un des-

¹Asociación Para Evitar la Ceguera en México, Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes”.

²Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Correspondencia: Dr. Luis Fernando Torres-Bernal. Real de los Reyes 87 C int 404, Los Reyes, Coyoacán, México DF. Email: ftorresb@yahoo.com

equilibrio entre diversos eventos celulares, dentro de los cuales sobresalen la proliferación y muerte celular (3). La proliferación de las células normales está regulada por moléculas de control estimuladoras e inhibidoras, correspondientes respectivamente a proto-oncogenes y genes supresores de tumores.

El gen p53, gen supresor tumoral, codifica para una fosproteína nuclear cuya función es frenar el crecimiento celular indiscriminado de una célula tumoral mediante la inducción de apoptosis (4). La mutación o pérdida del gen p53 es la alteración genética encontrada de forma más frecuente en el cáncer humano, y tiene como consecuencia la proliferación acentuada de las células tumorales sin la capacidad de freno o de inducción de muerte celular programada (5, 6). La forma natural de la proteína p53, debido a su corta vida media, no es detectable en tejidos normales. Sin embargo, la mutación del gen incrementa los niveles de proteína mediante un mecanismo de estabilización posttraduccional, lo que permite la detección inmunohistoquímica de la proteína p53 mutada, siendo el patrón de tinción nuclear el más frecuentemente observado, aunque también se ha reportado un patrón citoplasmático en otro tipo de tumores (7).

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

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

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

MATERIAL Y MÉTODOS

De los archivos del Servicio de Patología Oftálmica de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México se revisaron, de manera retrospectiva y aleatoria, casos con diagnóstico histopatológico de MAP y/o melanoma conjuntival. Las laminillas de los casos fueron reevaluadas. Del tejido residual (bloques de parafina) de estos mismos casos, se seleccionaron aquellos que contenían suficiente material representativo para la realización de estudio de inmunohistoquímica.

La información demográfica y clínica de los pacientes incluidos en el estudio se obtuvo de manera retrospectiva de los libros de patología. Se analizaron los siguientes datos: género, edad y ojo afectado. Los tumores fueron divididos en casos de MAP con atipia y/o melanoma conjuntival según las características histopatológicas del tejido analizado.

Inmunohistoquímica

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

Anticuerpos

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

Cuantificación

La interpretación de los patrones de inmunotinción se resume en el cuadro 1. De forma breve, para bcl-2 se consideró como positiva los casos con tinción citoplasmática, para p53 con tinción nuclear o citoplasmática y para PCNA los casos con tinción nuclear.

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

En los casos de tinción nuclear se identificaron las áreas con mayor intensidad de tinción “hot spots”, con los objetivos de 4X y 10X para cada tumor, se valoró el número de células positivas, en 10 campos con magnificación de 40X, los cuales fueron promediados en 10 campos para dar el grado de proliferación celular en cada caso.

Cuadro 1. Reacciones de inmunohistoquímica en melanoma conjuntival

Marcador	Inmunotinción células normales	Inmunotinción células mutadas	Consecuencia de mutación
PCNA	Tinción nuclear	Se incrementa el número de células teñidas con tinción nuclear	Incremento proliferación
p53	Ausente	Tinción nuclear o citoplasmático	Disminución apoptosis
bcl-2	Ausente	Tinción citoplasmática	Evasión apoptosis

La cuantificación de células neoplásicas inmunorreactivas se efectuó por medios manuales y no se utilizó un sistema automático de análisis de imagen debido a la interferencia que ocasiona la melanina con los núcleos inmunoteñidos con peroxidasa (cuadro 1).

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

Cuadro 2. Datos demográficos

Variable	MAP	Melanoma
N	4	5
Edad(años)	59 (25-84)	71 (46-81)
Sexo	M - 25% F -75%	M - 40% F -60%
Ojo	D - 50% I - 50%	D - 60% I - 40%

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

(SPSS Inc, Chicago III) para Windows fue utilizado para el análisis estadístico.

RESULTADOS

Datos demográficos

Se analizaron 4 casos de MAP con atipia y 5 casos de melanoma conjuntival. Los pacientes con melanoma conjuntival eran ligeramente mayores de edad en comparación con los casos de MAP (X=71 vs 59 años respectivamente). En todos los casos existió un ligero predominio del género femenino, correspondiendo a 75% de los pacientes con MAP y a 60% de los pacientes con melanomas. No se observó diferencia en cuanto al ojo afectado en los casos de MAP y existió una mayor afección del ojo derecho en el 60% de los casos de melanoma (cuadros 2 y 3).

Cuadro 3. Características clínicas e inmunohisquímicas de los casos

Caso	Diagnóstico	Características clínicas			Inmunohistoquímica	
		Edad	Sexo	Ojo	PCNA*	p53+
1	MAP	71	F	D	1	0
2	MAP	29	F	I	1	0
3	MAP	65	F	I	8	0
4	MAP	54	M	D	9	0
5	Melanoma	71	F	D	50	1
6	Melanoma	51	F	I	32	1
7	Melanoma	75	F	I	16	1
8	Melanoma	47	M	D	3	0
9	Melanoma	77	M	D	17	0

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

Análisis estadístico

El manejo estadístico se realizó con estadísticas no paramétricas. Las variables cuantitativas se resumieron en términos de mediana y rangos. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba U-Mann-Whitney. Las variables categóricas se resumieron en términos de frecuencias y porcentajes. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. El programa SPSS 12.0

Cuadro 4. Resultados inmunohistoquímica

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

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

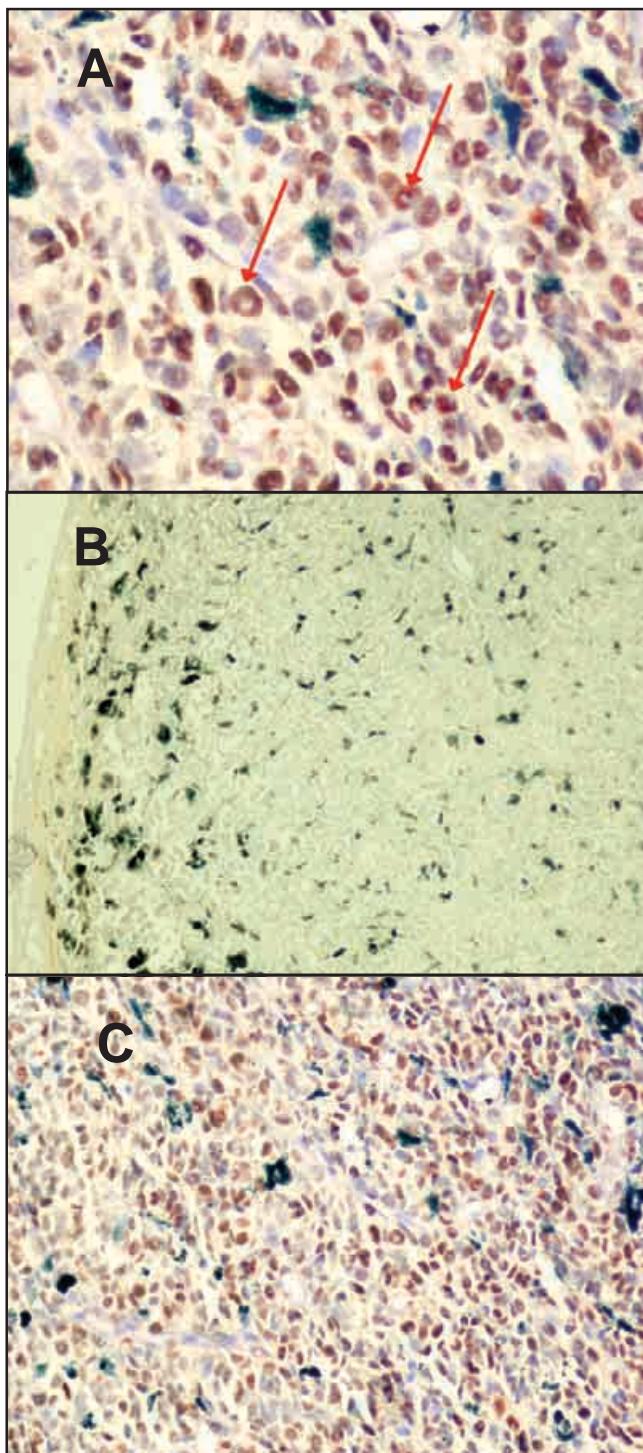


Fig. 1. **A.** Tinción nuclear intensa en un caso de melanoma conjuntival (flechas). **B.** Tinción nuclear leve en un caso premaligno de MAP. **C.** Tinción nuclear intensa en un caso de melanoma. (PCNA, sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, aumento original 40X (A) y 20X (B, C)).

Inmunohistoquímica (cuadro 4)

Tanto en los casos de MAP como en los de melanoma se encontró una inmunotinción positiva para el marcador PCNA, el cual es un fiel índice de proliferación celular en cualquier

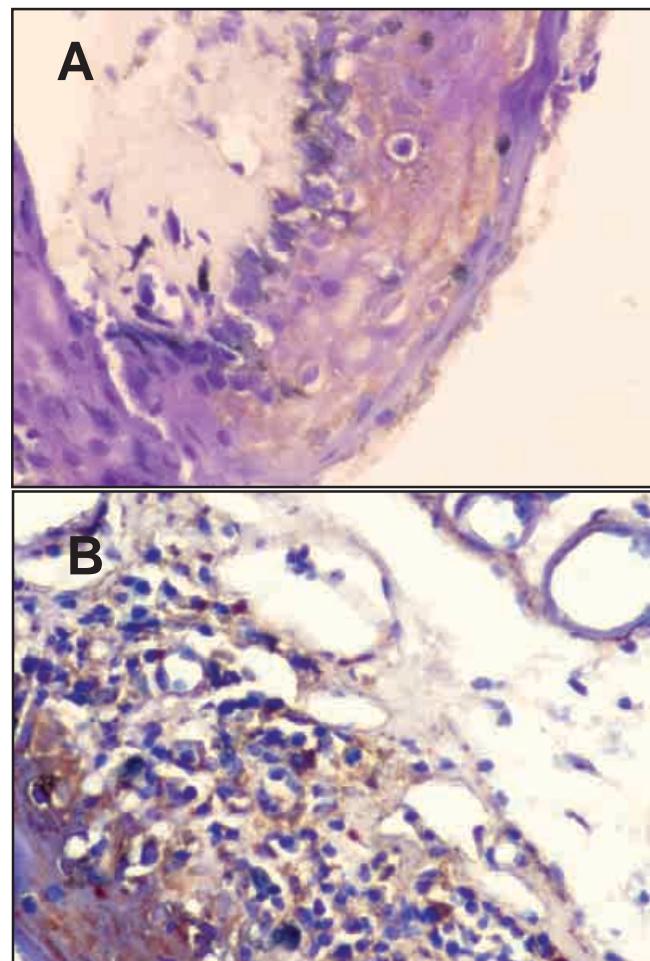


Fig. 2. Tinción citoplasmática. **A.** Ausencia de tinción de p53 en un caso premaligno de MAP, que contrasta con la positividad en un estadio maligno. **B.** (p53, sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, aumento original 20X (A, B)).

tejido. La tinción fue mayor en los melanomas conjuntivales en comparación con las MAP (mediana: 17, rangos de 3-50 vs 4.5 rangos de 0-9) (figura 1). De forma interesante demostramos una alteración en la expresión de p53 en el 60% de los casos de melanoma conjuntival analizados, siendo el patrón de tinción citoplasmático el más frecuente (figura 2B); a diferencia de esta malignidad ninguno de los casos benignos de MAP expresó esta proteína (figura 2A), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por último se debe señalar que, a diferencia de otro tipo de melanomas, no se encontró un sobre-expresión citoplasmática de bcl-2 en ninguno de los casos de MAP o melanomas (figuras 3A y 3B y cuadro 4).

DISCUSIÓN

La edad promedio de presentación de melanomas en diversas series varía de 52 a 60 años y los casos de MAP pueden presentarse 10 años antes (2, 15). En nuestros resultados encontramos una edad mediana de presentación mayor a la

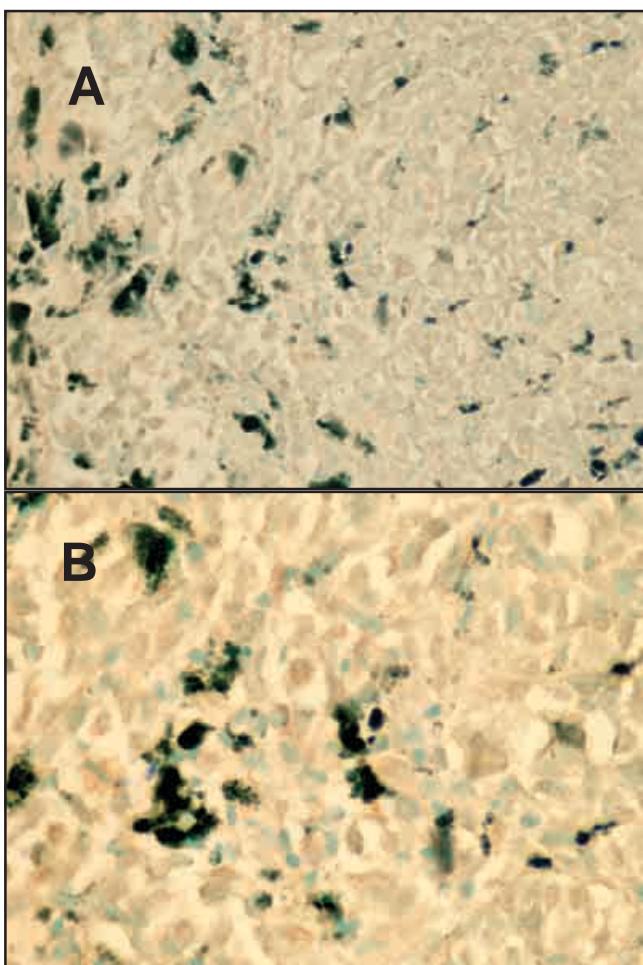


Fig. 3. **A.** Se observa ausencia de tinción citoplasmática tanto en un caso de MAP como de melanoma conjuntival (**B**). (bcl-2, sistema biotina-estreptoavidina-diaminobenzidina, aumento original 20X (A, B).

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

El índice de proliferación celular utilizando PCNA se ha descrito como un factor pronóstico independiente de sobrevida (16), ya que su expresión se encuentra incrementada en lesiones de mayor grado de malignidad tanto en el melanoma cutáneo como en el uveal (17-19). Nosotros

encontramos una mayor expresión de PCNA en los casos de melanoma en comparación con los de MAP, lo que demuestra una relación directamente proporcional entre la proliferación celular medida por PCNA y el grado de malignidad de la lesión conjuntival. Hasta este momento este es el primer reporte que establece esta relación en la secuencia MAP-melanoma conjuntival ya que en el único reporte previo de expresión de PCNA sólo se determinó en melanomas conjuntivales, donde se encontró puede funcionar como un factor pronóstico para determinar una menor sobrevida (20).

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

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

existen otras vías implicadas en la oncogénesis de este tumor como p53 o pRb.

La conexión entre las vías de pRb y p53 proveen una barreira contra la oncogénesis en los tejidos normales, la cual hemos demostrado se encuentra alterada en la secuencia MAP-melanoma conjuntival. Por otra parte nuestros resultados sugieren que existe una heterogeneidad genética entre los melanomas cutáneos, uveales y conjuntivales a pesar de su origen embrionario común, probablemente debido a variaciones ambientales y regionales, lo que puede explicar las diferencias en el comportamiento biológico de los diferentes tipos de melanomas dependiendo de su localización anatómica (39).

CONCLUSIÓN

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

REFERENCIAS

1. Shields CL. Conjunctival melanoma: risk factors for recurrence, exenteration, metastasis, and death in 150 consecutive patients. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000; 98:471-92.
2. Seregard S. Conjunctival melanoma. *Surv Ophthalmol* 1998; 42(4):321-50.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
4. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9(4):138-41.
5. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A y cols. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6(9):1699-703.
6. Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.
7. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9(5): 1595-602.
8. Mitselou A, Ioachim E, Kitsou E, Vougiouklakis T, Zagorianakou N y cols. Immunohistochemical study of apoptosis-related Bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki67, PCNA), tumor suppressor genes (p53, pRb), the oncogene c-erbB-2, sex steroid hormone receptors and other clinicopathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In Vivo* 2003; 17(5):469-77.
9. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15:105-118.
10. Brantley MA Jr, Harbour JW. Dereulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol* 2000; 157:1795-1801.
11. Kelman Z. PCNA structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997; 14; 629-640.
12. Ben-Izhak O, Bar-Chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J y cols. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology* 2002; 41(6):519-25.
13. Loggini B, Rinaldi I, Pingitore R, Cristofani R, Castagna M, Barachini P. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanomas: p53, PCNA, Bcl-2 expression and multidrug resistance. *Tumori* 2001; 87(3):179-86.
14. Mooy CM, Luyten GPM, De Jong PTVM, Luider TM, Stijnen T, Van de Ham F y cols. Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* 1995; 147:1.097-1.104.
15. Rodriguez-Reyes AA, Rios y Valles-Valles D, Corredor-Casas S, Gomez-Leal A. Advanced conjunctival melanoma. *Can J Ophthalmol* 2004; 39(4):453-60.
16. Niezabitowski A, Czajecski K, Rys J, Kruczak A, Gruchala A y cols. Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol* 1999; 70(3):150-60.
17. Iyengar B. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): proliferative phase functions and malignant transformation of melanocytes. *Melanoma Res* 1994; 4(5):293-5.
18. Bjornhagen V, Bonfoco E, Brahme EM, Lindholm J, Auer G. Morphometric, DNA, and proliferating cell nuclear antigen measurements in benign melanocytic lesions and cutaneous malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1994; 16(6):615-23.
19. Vecchiato A, Rossi CR, Montesco MC, Frizzera E, Seno A y cols. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and recurrence in patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 1994; 4(4):207-11.
20. Seregard S. Cell proliferation as a prognostic indicator in conjunctival malignant melanoma. *Am J Ophthalmol* 1993; 116(1):93-7.
21. Seregard S. Cell growth and p53 expression in primary acquired melanosis and conjunctival melanoma. *J Clin Pathol* 1996; 49(4):338-42.
22. Tobal K, Warren W, Cooper CS, McCartney A, Hungerford J, Lightman S. Increased expression and mutation of p53 in choroidal melanoma. *Br J Cancer* 1992; 66:900-904.
23. Korabiowska M, Brinck U, Hoenig JF y cols. Significance of p53 antigen in malignant melanomas and naevi of the head and neck area. *Anticancer Res* 1995; 15:855-859.
24. Jay M, McCartney ACE. Familial malignant melanoma of the uvea and p53: A Victorian detective story. *Surv Ophthalmol* 1993; 37:457-462.
25. Janssen K, Kuntze J, Busse H, Schmid KW. p53 oncoprotein overexpression in choroidal melanoma. *Mod Pathol* 1996; 9:267-272.
26. Stretch JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 4976-5979.
27. Volkenandt M, Schlegel U, Nanus DM, Albino AP. Mutational analysis of the human p53 gene in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 1991; 4:35-40.
28. Sparrow LE, Soong R, Dawkins HJ, Iacopeta BJ, Heenan PJ. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995; 5:93-100.
29. Weis J, Heine M, Arden KC. Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res* 1995; 139:137-154.
30. Rhim KJ, Hong SI, Hong WS, Lee SY, Lee DS, Jang JJ. Aberrant expression of p53 gene product in malignant melanoma. *J Korean Med Sci* 1994; 9:376-381.

31. Barnhill RL, Castresana JS, Rubio MP y cols. p53 expression in cutaneous malignant melanoma: an immunohistochemical study of 87 cases of primary, recurrent, and metastatic melanoma. Mod Pathol 1994; 7:533-535.
32. Van Den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. Am J Pathol 1994; 145:294-300.
33. Plettenberg A, Ballum C, Pammer J, Mildner M, Strunk D, Weninger W y cols. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 protooncogene in situ and in cell culture. Am J Pathol 1995; 146:651-659.
34. Morales-Ducret CR, Van de Rijn M, Lebrun DP, Smoller Br. bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. Arch Dermatol 1995; 131:909-912.
35. Cerroni L, Soyer HP, Kerl H. bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. Am J Dermatopathol 1995; 17:7-11.
36. Ramsay JA, From L, Kahn HJ. bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. Mod Pathol 1995; 8:150-154.
37. Radhi JM. Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components. J Cutan Med Surg 1999, 3:293-297
38. Sulkowska M, Famulski W, Bakunowicz-Lazarczyk A, Chyczewski L, Sulkowski S. Bcl-2 expression in primary uveal melanoma. Tumori 2001; 87(1):54-7.
39. Chana JS, Wilson GD, Cree IA, Alexander RA, Myatt N, y cols. c-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma. Br J Ophthalmol 1999; 83:110-114.

Cita histórica:

En 1882, **Paul Ehrlich** reporta la presencia de fluoresceína intraocular después de su administración parenteral en conejos. *Ehrlich P. Über provicirte fluorescenzerscheinungen am Auge. Dtsch Med Wochenschr 8:21, 1882.*