

CAPÍTULO

4.12

Melanoma uveal. Biopsia intraocular

*Mónica Asencio-Duran, José Vicente Dabad Moreno, Blanca Vicandi Plaza***INTRODUCCIÓN**

El diagnóstico de los tumores intraoculares, a diferencia de la gran mayoría de tumores de otras especialidades oncológicas en las que la confirmación histológica es la regla, se basa de forma fiable en la exploración clínica y las técnicas de imagen no invasivas (como la funduscopia, ecografía, biomicroscopía ultrasónica, tomografía de coherencia óptica, autofluorescencia, angiografía fluoresceínica o con verde de indocianina, resonancia magnética o PET/TAC)(1), mientras que la biopsia intraocular diagnóstica está en controversia. Las principales dudas a la hora de realizar la biopsia de tumores intraoculares radican en el riesgo de diseminación tumoral como consecuencia del procedimiento invasivo, y otras complicaciones potenciales como la toma de una muestra pequeña o inválida, heterogeneidad intratumoral y el daño perioperatorio a las estructuras intraoculares adyacentes como la retina. A pesar de estos inconvenientes, en un pequeño porcentaje de los casos se requiere la obtención de tejido para establecer el diagnóstico definitivo y planificar el tratamiento preciso. Debido al desarrollo del pronóstico citogenético del melanoma uveal (MU) y la extensión generalizada del tratamiento, la biopsia de melanoma intraocular es cada vez más importante. La biopsia tumoral pronóstica obtiene una muestra de tejido para pruebas citogenéticas tumorales, que pueden ayudar a determinar el pronóstico y el riesgo individual de desarrollar metástasis del paciente.

INDICACIONES DE LA BIOPSIA DIAGNÓSTICA EN LOS TUMORES INTRAOCULARES

La principal indicación de la «biopsia diagnóstica» consiste en la confirmación o exclusión de la sospecha clínica de malignidad en casos dudosos

donde la clínica y las pruebas diagnósticas no son capaces de proporcionarnos el diagnóstico, lo cual ocurre sólo en el 1-2% de los casos (2). Habitualmente en: presentaciones atípicas, opacidad de medios, sospecha de metástasis sin tumor primario conocido y la petición expresa de diagnóstico citogenético por parte del paciente.

Otra indicación relativa la constituyen las lesiones melanocíticas uveales de pequeño tamaño (altura máxima de hasta 3 mm). La estrategia habitual en estos casos (que incluyen tanto nevus atípicos como melanomas pequeños o incipientes, en ocasiones muy difíciles de diferenciar) es la observación regular, mientras que la terapia se inicia solo después de la identificación de la progresión de la lesión. Sin embargo, la tendencia actual considera que el diagnóstico y el tratamiento precoz de lesiones tumorales incipientes podría mejorar el pronóstico de supervivencia del paciente (3,4). Sin embargo, al tratarse de lesiones de pequeño tamaño y localización posterior frecuente, existe mayor riesgo de tomar una muestra insuficiente y de desarrollar complicaciones oculares que amenacen la visión.

En las últimas décadas está aumentando la indicación de la «biopsia pronóstica» tumoral, con el fin de obtener una muestra de tejido también para el análisis citogenético del tumor (5). Esto permite una caracterización genética y molecular fiable para la determinación del pronóstico, la evaluación del riesgo metastásico específico para cada paciente y la configuración individual de la frecuencia y pruebas de seguimiento (análisis de laboratorio, ecografía de abdomen, radiografía de tórax, etc), así como la búsqueda de nuevos objetivos moleculares de terapia sistémica en pacientes con afección metastásica, de caras a su inclusión en programas terapéuticos en el marco de ensayos clínicos sobre la base del perfil molecular del tumor (6).

TÉCNICAS E INSTRUMENTACIONES

Desde la excisión quirúrgica hasta la Punción-Aspiración con aguja fina (PAAF) se han publicado varias técnicas en la literatura. Las técnicas más empleadas en el diagnóstico de los tumores intraoculares son: aspiración de fluidos oculares (acuoso, vítreo), PAAF, biopsia mediante punch, biopsia quirúrgica y vitrectomía diagnóstica. La técnica empleada dependerá del tejido afectado, del diagnóstico de sospecha, del tamaño y localización de la tumoración, y de la presencia de desprendimiento de retina asociado o de la opacidad de medios. El citopatólogo tiene un papel muy importante en la interpretación de estas muestras.

TUMORES DEL SEGMENTO ANTERIOR DEL OJO

Aspirado de acuoso

En el caso de lesiones seleccionadas del iris (melanoma de iris difuso o metástasis de iris) con diseminación aparente en la cámara anterior, simulando uveítis o infección de cámara anterior (CA)(6). Se emplea una aguja de 26 a 30 G, a través de la córnea y limbo, y mediante un ángulo de 45-90° sobre la superficie del tumor se aspiran unos 0,5 ml de acuoso de CA (fig. 1B)(7). Se ha descrito en el caso del melanoma niveles más altos de angiogenina, IL-8 y MCP-1 (8). En casos de sospecha de retinoblastoma atípico, se debe de realizar con extrema precaución para evitar la diseminación extraocular (9).

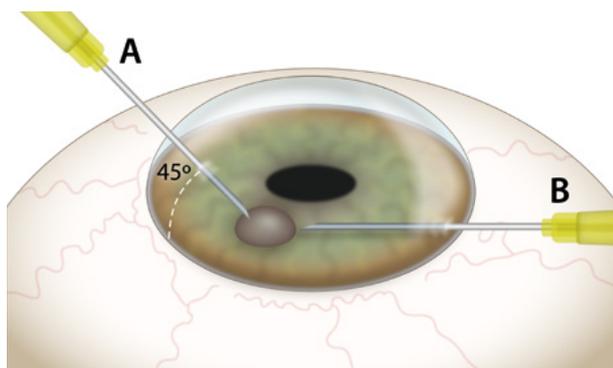


Fig. 1: **A.** Técnica de citología de acuoso (aspirado) para tumores iridianos. La punción se realiza por córnea con una angulación de 45° sobre la tumoración. **B.** Técnica de PAAF en tumor iridiano. La entrada se realiza por limbo paralela al plano de iris a 90° del meridiano del tumor, y sin llegar a pupila para evitar traumatismos del cristalino.

PAAF de iris

La técnica es similar a la aspiración, aunque la aguja penetra por el limbo aproximadamente a 90° del meridiano del tumor y de forma paralela al iris realiza una inserción directa sobre el tumor (fig. 1A)(10). Generalmente en toda PAAF el aspirado celular se realiza de forma manual por el ayudante manteniendo la presión negativa en la jeringa conectada a la aguja, hasta que la aguja se extrae del ojo (9-11).

Biopsia de iris mediante vitrectomía (técnica de Finger)

En esta técnica, se inserta un mantenedor de cámara anterior y mediante una segunda incisión limbal, se introduce el vitrectomo de 25G en CA, con la apertura hacia el tejido tumoral. Se utilizan aspiraciones altas (600 mm Hg) y frecuencias de corte bajas (300 cortes/min), para obtener pequeñas secciones de la superficie del tumor (fig. 2)(6,10,12).

Biopsia quirúrgica de iris

La iridectomía quirúrgica proporciona una cantidad suficiente de tejido para el análisis histopatológico, inmunohistoquímico y citogenético. En la práctica clínica se utiliza principalmente como «biopsia excisional», con la eliminación de todo el tejido neoplásico. Los abordajes más frecuentes según la localización tumoral son la iridectomía (indicada en lesiones accesibles del iris y ángulo iridocorneal, figura 3A) y la iridociclectomía o esclerouveectomía

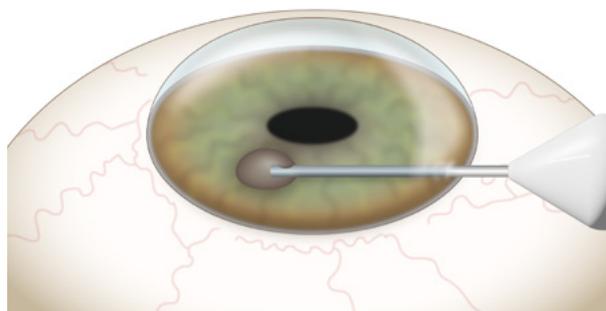


Fig. 2: Técnica de iridectomía de Finger. El vitrectomo se inserta en la cámara anterior para ocluir el tumor con el puerto de aspiración. Con potencia de aspiración (300 mmHg) a unos 600 cortes/minuto se elimina el tumor.

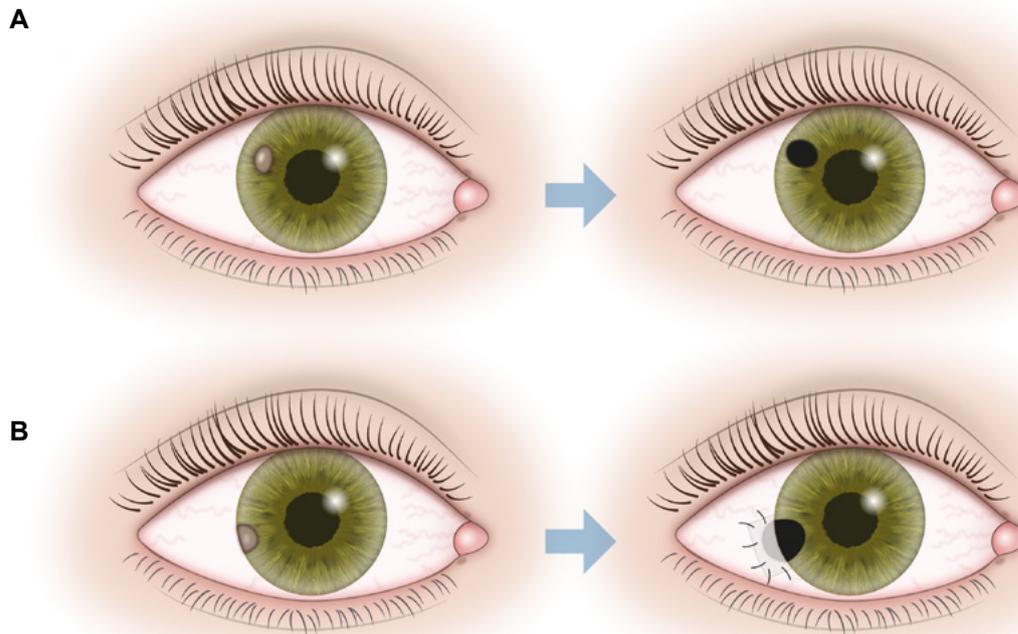


Fig. 3: Técnicas de biopsia excisional de iris. **A.** Iridectomía. **B.** Iridociclectomía o esclerouveectomía parcial.

parcial (indicada en lesiones de iris y cuerpo ciliar, figura 3B). La desventaja de este procedimiento es el defecto iatrogénico extenso y secundario del iris. La «biopsia incisional» de iris se puede realizar mediante «punch» o pinzas de biopsia de Essen de 23 G (6).

TUMORES DE SEGMENTO POSTERIOR

PAAF en tumores de segmento posterior: Abordaje transescleral

Indicado en tumores del cuerpo ciliar ó coroides anterior. Se utiliza una aguja de calibre fino (25-27G) conectada o no a una vía alargadera (recomendable para evitar la tracción ejercida por el ayudante al realizar el vacío en la jeringa). Se realiza un flap escleral de 3 mm² de 80% profundidad, y se realiza la incisión con la aguja en el lecho del mismo (figs. 4A y 5)(13). Se recomienda marcar previamente en la aguja con un rotulador dérmico el espesor tumoral mayor para evitar perforar la retina, aunque existen agujas de 25G marcadas milimétricamente que pueden cumplir esta función (14) (vídeo 1). Se puede emplear la pinza de Essen de 23G para la extracción del tejido, lo cual aumenta el rendimiento de la muestra (6). Se recomienda pre-suturar el tapete escleral antes

de realizar la PAAF, para poder cerrarlo inmediatamente después de la aspiración del material y así evitar la diseminación (fig. 5), y justo antes del implante de placa de braquiterapia, que se colocará encima del tapete.

PAAF en tumores de segmento posterior: Abordaje transvítreo

Indicado en tumores posteriores al ecuador. Se utiliza una aguja 25-30G larga conectada a alargadera (fig. 4B). Se incide desde el lado contrario a 180° del tumor y a 4 mm del limbo mediante control bajo oftalmoscopio indirecto o microscopio quirúrgico (15). En tumores de pequeño espesor se puede doblar la aguja 90° para permitir una entrada tangencial en el tumor. Una vez que la aguja se



Vídeo 1: Abordaje transescleral.

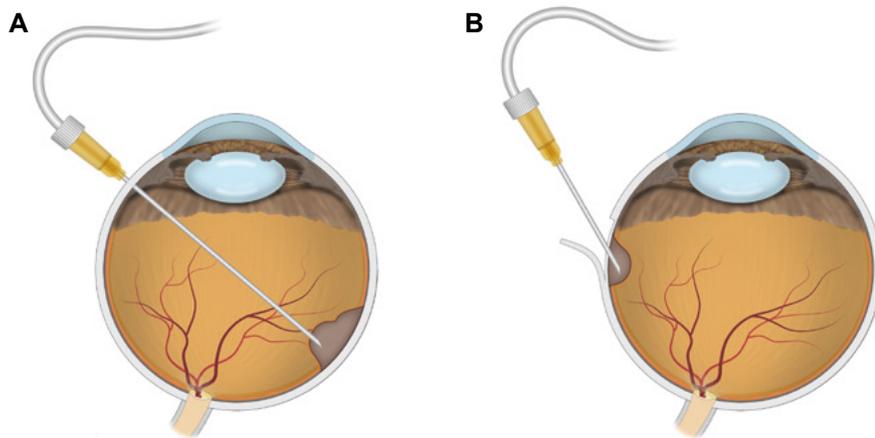


Fig. 4: Técnica de PAAF para citología de tumores de segmento posterior. **A.** Abordaje transescleral. Indicado en tumores anteriores al ecuador del ojo, realizada mediante tapete o «flap» escleral. **B.** Abordaje transvítreo. Indicado en tumores posteriores al ecuador. La punción se realiza a 4 mm del limbo esclero-corneal. La visualización del trayecto de la aguja se puede realizar a través de la pupila dilatada vía oftalmoscopia indirecta o mediante microscopio quirúrgico y sistema de inversión de imagen. La aspiración del material celular se puede realizar de forma manual mediante jeringa y alargadera (recomendable), o mediante el sistema de aspiración automatizada del vitrectomo.

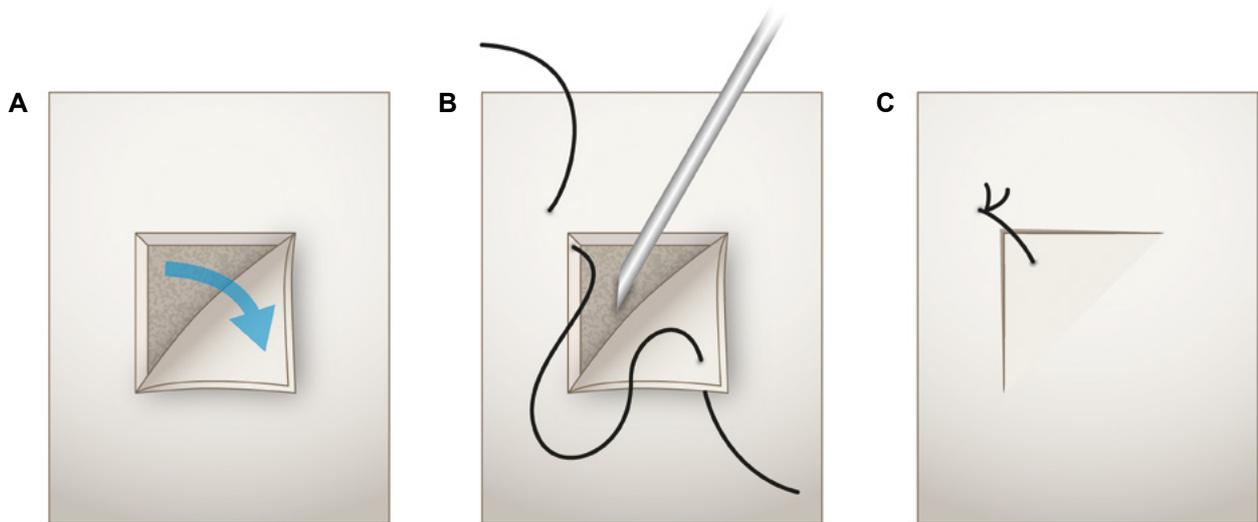
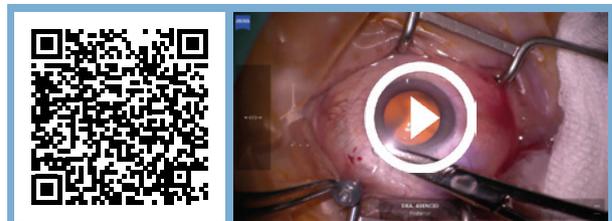


Fig. 5: Detalle del procedimiento de realización del tapete o «flap» escleral, de una profundidad del 80% de esclera (**A**), se debe pre-suturar antes de hacer la punción (**B**) y se debe suturar inmediatamente tras la extracción de la muestra (**C**).

ha insertado en el tumor, ésta bajo control visual se puede rotar alrededor de su eje para obtener más material, y una vez aspirada la cantidad celular necesaria, se debe mantener la presión negativa en la jeringa hasta que la aguja salga del ojo para evitar la diseminación. La extracción de la aguja se tiene que hacer de forma rápida para evitar la hipotonía (vídeo 2). Si ésta se produce, se puede inyectar solución salina balanceada en la cavidad vítrea. La retinotomía resultante (en el lugar de toma de la muestra), suele cerrarse espontáneamente. Después de suturar la esclerotomía, es posible realizar la criopexia (6,16-18).

El rendimiento diagnóstico de la PAAF depende del abordaje, con un 66-96% por vía transescleral y 71-86% transvítrea ($p = 0,029$), y del tamaño tumoral (18,19).



Vídeo 2: Biopsia transvítrea.

Biopsia mediante Vitrectomía en tumores de segmento posterior

Este abordaje se realiza mediante vitrectomía estándar de tres puertos con sistemas de microincisión (25 y 27G) y cánulas valvuladas. Tras una hialoidectomía y una vitrectomía local sobre el tumor, se selecciona un área elevada y avascular del mismo que se incide con el vitrectomo en modo corte o con un miringotomo/cuchillete MVR. Mediante vitrectomo se incide en el tumor con una tasa de corte baja (aprox. 100 cortes/min), una aspiración alta (400-600 mm Hg) y se incrementa la presión intraocular para evitar la hemorragia (vídeo 3) (6,9,11,20). biopsia asociada a vitrectomía). El material se extrae del vitrectomo o por vía retrógrada (mediante inyección de aire con jeringa por la vía de aspiración del vitrectomo y dejando gotear el material por la punta del vitrectomo a un recipiente estéril), o directamente desde la vía de aspiración del vitrectomo mediante una jeringa. Permite obtener muestras más celulares que las obtenidas con PAAF, a pesar de tener más complicaciones, pero es especialmente útil si es necesaria la extirpación del vítreo. La retinotomía producida por la punción es pequeña, y generalmente no requiere taponamiento con gas ni tratamiento mediante fotocoagulación (21).

La biopsia incisional mediante vitrectomía y pinza de Essen de 23G también proporciona un acceso sin necesidad de sutura posterior y permite la obtención de mayor cantidad de tejido, sin embargo, requiere de una incisión previa en el tumor de al menos 0,6 mm, con el consiguiente riesgo de diseminación tumoral y de que la muestra quede incrustada en el puerto escleral (6,22). Este abordaje requiere de vitrectomía completa, taponamiento de la rotura mediante endodiatermia e inyección final de gas intraocular por el incremento del riesgo de desprendimiento de retina secundario.



Vídeo 3.

COMPLICACIONES DE LA BIOPSIA INTRAOCULAR

Desde los primeros resultados sobre PAAF que se publicaron en 1979 (Jacobiek), su uso se ha extendido, sin embargo, la principal causa de la baja utilización es su carácter invasivo y el riesgo de diseminación tumoral que conlleva (23), que se ve disminuido cuando se realiza en manos expertas y con calibre de aguja fino. El segundo problema consiste en la heterogeneidad histopatológica y citogenética dentro del propio tumor que puede conducir a falsos negativos (6,9,11). Otras complicaciones locales son la hemorragia local (fig. 6) que típicamente aclara en pocos días, la hemorragia vítrea y subretiniana que ocurre en el 9-13% con disminución transitoria de visión, y otras teóricas como el desprendimiento de retina, la endoftalmitis y la diseminación sistémica, con muy baja incidencia ($\leq 1\%$) (18,24).

PREPARACIÓN CITOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIA INTRAOCULAR

Al realizar la PAAF, en el momento de extracción de la aguja del tumor, se deben tener en cuenta las siguientes precauciones: mantener la presión nega-

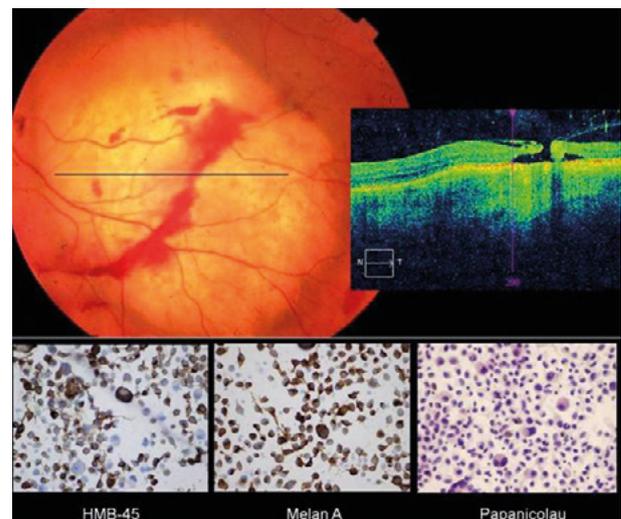


Fig. 6: Superior. Complicaciones locales tras PAAF. Hemorragia local tras PAAF transvítrea en paciente con sospecha de metástasis coroidea sin tumor primario conocido. En el corte mediante tomografía de coherencia óptica se aprecia la retinotomía resultante de pequeño tamaño. Inferior. Aspirado celular obtenido tras PAAF transvítrea. Estudio citológico compatible con el diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar secretor oculto (Corresponde al caso del vídeo Abordaje transvítreo).

tiva en la jeringa (evita reflujo y la consecuente pérdida de células y/o diseminación), lavado profuso de jeringa, tubo conector y la aguja para extraer todo el material posible, y su envío rápido al laboratorio. El material celular que se remite a citología puede ir:

- En fresco: en portas, mediante extensión directa, secados al aire.
- Fijado: en suspensión en fluido de citología líquida, como Cytolyt® u otro medio de transporte (fig. 7).

Para el procesado, los portas secados al aire se tiñen con técnica de Diff-Quick, mientras que la suspensión en líquido fijador se somete a técnicas de concentración celular (citospin) y tinción con Papanicolaou, y si fuera necesario, inmunohistoquímica. Es fundamental la interpretación por un citopatólogo experimentado debido al escaso rendimiento celular que en ocasiones se obtiene.

DIAGNÓSTICO CITOGÉNÉTICO EN MELANOMA UVEAL

La citología en el MU muestra los característicos gránulos de melanina que aparecen en casi el 80% de los casos y la atipia característica de las células malignas (25). El MU se puede clasificar según el tipo celular en 3 subtipos: fusiforme, epitelioide y mixto (*Clasificación modificada de Callender*). El subtipo

con presencia de células epitelioides, presente en menos del 2% de los casos (25), se relacionada con metástasis a distancia y el aumento del porcentaje de células epitelioides con el pronóstico de estos pacientes (26). El subtipo de células fusiformes se asocia a mejor pronóstico y es más frecuente junto con el subtipo mixto, ambos en torno a un 45-50%.

La mayor rentabilidad pronóstica en MU se obtiene mediante el estudio de estas células con un simple cariotipo. La monosomía del cromosoma 3 aparece en el 50% (27), y diferentes estudios demuestran que el 24% de los pacientes desarrollan metástasis al cabo de 3 años (28). Otras alteraciones como la pérdida del 8p o del 6q, y la ganancia del 8q se encuentran en mayor riesgo de enfermedad metastásica. Delecciones y heterozigosis pueden pasar inadvertidas mediante cariotipo y FISH (29). En general estas alteraciones están relacionadas directamente con el tamaño tumoral (28). En 2017, se creó una nueva clasificación pronóstica, TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), que divide en 4 subtipos moleculares: 2 asociados a buen pronóstico (disomía 3) y 2 asociados a pobre pronóstico (monosomía 3)(30,31).

El estudio genético se debe centrar en 3 mutaciones excluyentes entre sí: BAP1, asociada a un mayor riesgo de metástasis y mayor mortalidad, presente entre un 20-40% (27); y mutaciones en los genes E1F1AX y SF3B1, que se consideran biomarcadores de riesgo bajo e intermedio, respectivamente (32).



Fig. 7: Izquierda. Extracción del aspirado celular tras PAAF. Lavado retrógrado profuso de aguja y vía utilizadas mediante aire (cuando se requiere en fresco) o mediante Cytolyt® (cuando se requiere la muestra fijada). En cada procedimiento se pueden requerir de 1 a varias punciones. Centro. Medio de transporte para procesamiento, tinción y diagnóstico citológico usado en nuestro centro (Cytolyt®, Hologic Inc, Marlborough, MA, USA) Derecha. Portas con muestra en fresco y frascos con muestra fijada en Cytolyt®.

Las nuevas técnicas moleculares son superiores en cuanto a precisión en el pronóstico del MU; como SNP array (*Single-Nucleotide polymorphism*), MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) y GEP (*Gene expression profiling*), test comercial validado que mide mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) la expresión de 15 genes presentes en el MU y permite una clasificación de riesgo metastásico en Clase 1 (bajo riesgo) y Clase 2 (alto riesgo)(33,34). Los tumores de Clase 2 se correlacionan con mayor edad del paciente, mayor grosor y diámetro del tumor, subtipos celulares mixto y epitelioide, y la localización en el CC (29,35). Las técnicas más rentables para pronóstico son MLPA y GEP, ya que ambas requieren menos de 200 células (18), pero no diagnostican la línea celular en caso de duda diagnóstica, y

son susceptibles de variación según la localización de la muestra (12,18,29).

El estudio del antígeno *PRAME* (*preferentially expressed antigen in melanoma*) mediante rt-PCR constituye un biomarcador independiente de riesgo aumentado de metástasis en los tumores de Clase 1 y 2 (29,35,36).

DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO EN TUMORES INTRAOCULARES

Las técnicas inmunohistoquímicas generalmente sólo son necesarias en el diagnóstico diferencial de las lesiones amelanóticas, sobre todo cuando se sospecha una metástasis coroidea, teniendo la biopsia en estos casos una correlación con la histología del 95% (37). Ante una posible metástasis

Tabla 1. Marcadores inmunohistoquímicos más utilizados en tumores melanocíticos (20)

Marcador	Tipo Anticuerpo	Función	Especificidad
Vimentina	Ac Monoclonal	Céls mesenquimales	++/+++
Proteína S-100	Ac Policlonal	Tumores melanocíticos 1° y 2°	+++
HMB-45	Ac Monoclonal	Antimelanosomas	+++
Melan A	Antígeno	Proteína transmembrana en el 90% melanomas	+++
Ki-67	Antisuero	Proteína de núcleos en proliferación	++
p53	Ac Monoclonal	Proteína de la mitosis (gen supresor)	+
Bcl-2	Ac Monoclonal	Proteína inhibidora apoptosis (oncogen)	+
c-erb-B2	Ac Policlonal	Porción intracitoplásmica de la membrana celular	+

Tabla 2. Marcadores inmunohistoquímicos más utilizados en tumores no melanocíticos (21)

Tinción	Tipo Ac	Detecta	Ejemplo
CD3	Ac Monoclonal	Pan marcador céls T, timocitos, natural T-killer	Neoplasias de céls T
CD20 y PAX-5	Ac Monoclonal	Marcadores céls B	Neoplasias de céls B (L. Hodgkin)
CD138, MUM1/IRF4	Ac Monoclonal	Marcadores de céls plasmáticas	Plasmocitoma- Mieloma múltiple
CD 34, CD117	Ac Monoclonal	Blastos hematopoyéticos	LMA-Sd. mielodisplásicos
CD68	Ac Monoclonal	Pan marcador macrófagos-monocitos	Estudio de macrófagos que infiltran una neoplasia
CK7, CK 20	Ac Monoclonal	Citoqueratinas	Útil para aproximar 1° en caso de metástasis (Neo epitelial: ej. Mama)
TTF-1	Ac Monoclonal	Factor de transcripción tiroideo 1	80% de adenoCa pulm 1° y metastásico, Neoplasia tiroides
PSA	Ac Monoclonal	Ag específico prostático	Céls 1° y metastásicas prostáticas
Actina - desmina	Ac Monoclonal	Marcadores de músculo liso	Leiomioma

coroidea, la morfología celular, la cohesión celular y la ausencia de melanina, suelen ser suficientes, pero en casos de ausencia de tumor primario conocido se debe priorizar la inmunohistoquímica (tabla 1 y tabla 2)(37,38).

Generalmente la realización de estas técnicas especiales requiere de reactivos y/o medios de

transporte específicos que hay que coordinar antes de realizar la extracción de la muestra, para evitar la pérdida de las células y la necesidad de repetir el procedimiento, y en ocasiones no están disponibles en el propio centro, por lo que hay que contactar previamente con el departamento que vaya a realizar las determinaciones.

MENSAJES CLAVE A RECORDAR

- Las biopsias intraoculares se deben realizar por personal experimentado y contando con la participación de un equipo coordinado en el cual la técnica de extracción de la muestra tiene que ser cuidadosamente seleccionada, y la muestra adecuadamente recogida y analizada por un citopatólogo experimentado.
- La biopsia tumoral diagnóstica se debe reservar para casos muy seleccionados de lesiones clínicamente dudosas.
- En el melanoma uveal (MU) la biopsia pronóstica ha experimentado un incremento en importancia debido al análisis citogenético tumoral que permite establecer el riesgo de desarrollo de metastásis y el tratamiento sistémico individualizado para cada paciente específico.
- En lesiones intraoculares amelanóticas, si el estudio clínico y de extensión del paciente es negativo, la biopsia tumoral diagnóstica es primordial y se debe realizar previa coordinación con los servicios de citopatología ocular para evitar la realización procedimientos innecesarios y repetidos al paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kivelä T. Diagnosis of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol* 2012; 49: 1-15.
2. Aronow ME, Biscotti CV, Chan CC, Singh AD. The Role of Biopsy in the Assessment of Uveal Melanoma. *Retinal Physician* 2012;9,13-17.
3. Boldt HC, Binkley E. Treating Small Choroidal Melanoma: Smaller Is Better. *JAMA Ophthalmol* 2018; 136(12): 1333-1334.
4. Mortality in patients with small choroidal melanoma. COMS report no. 4. The Collaborative Ocular melanoma Study Group. *Arch Ophthalmol* 1997; 115(7): 886-893.
5. Bagger MM. Intraocular biopsy of uveal melanoma Risk assessment and identification of genetic prognostic markers. *Acta Ophthalmol* 2018; 96: 1-28.
6. Frizziero L, Midena E, Trainiti S, Londei D, Bonaldi L, Bini S, et al. Uveal Melanoma Biopsy: A Review. *Cancers (Basel)* 2019; 11(8): 1075.
7. Grossniklaus HE. Fine-needle aspiration biopsy of the iris. *Arch Ophthalmol* 1992; 110(7): 969-976.
8. Usui Y, Tsubota K, Agawa T, Ueda S, Umazume K, Okunuki Y, et al. Aqueous immune mediators in malignant uveal melanomas in comparison to benign pigmented intraocular tumors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017; 255(2): 39-399.
9. Shields CL, Manquez ME, Ehya H, Mashayekhi A, Danzig CJ, Shields JA. Fine-needle aspiration biopsy of iris tumors in 100 consecutive cases: Technique and complications. *Ophthalmology* 2006; 113(11): 2080-2086.
10. Finger PT, Latkany P, Kurlli M, Iacob C. The Finger iridectomy technique: small incision biopsy of anterior segment tumours. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 946-949.
11. Singh AD, Biscotti CV. Fine needle aspiration biopsy of ophthalmic tumors. *Saudi J Ophthalmol* 2012; 26(2): 11-123.
12. Bechrakis NE, Foerster MH, Bornfeld N. Biopsy in indeterminate intraocular tumors. *Ophthalmology* 2002; 109(2): 235-242.
13. Gündüz K, Shields JA, Shields CL, Eagle RC Jr, Diniz W, Mercado G, et al. Transscleral choroidal biopsy in the diagnosis of choroidal lymphoma. *Surv Ophthalmol* 1999; 43(6): 551-5.
14. Pelayes DE, Zárate JO, Biscotti CV, Singh AD. Calibrated needle for ophthalmic fine needle aspiration biopsy. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(8): 1147-1148.
15. Augsburger JJ, Shields JA. Fine needle aspiration biopsy of solid intraocular tumors: indications, instrumentation and techniques. *Ophthalmic Surg* 1984; 15: 34-40.
16. Shields CL, Materin MA, Teixeira L, Mashayekhi A, Ganguly A, Shields JA. Small choroidal melanoma with chromosome 3 monosomy on fine-needle aspiration biopsy. *Ophthalmology* 2007; 114(10): 1919-1924.
17. Rishi P, Dhami A, Biswas J. Biopsy techniques for intraocular tumors. *Indian J Ophthalmol* 2016; 64(6): 415-421.
18. Singh AD, Medina CA, Singh N, Aronow ME, Biscotti CV, Triozzi PL. Fine-needle aspiration biopsy of uveal melanoma: Outcomes and complications. *Br J Ophthalmol* 2016; 100: 456-462.
19. Chang MY, McCannel TA. Comparison of uveal melanoma cytopathologic sample retrieval in trans-scleral versus vitrectomy-assisted transvitreal fine needle aspiration biopsy. *Br J Ophthalmol* 2014; 98: 1654-1658.
20. Tang PH, Shields RA, Scheffler AC, Mruthyunjaya P. Biopsy of a Choroidal Melanoma Using Transvitreal Pars Plana Vitrectomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2018; 49(8): 645-647.

21. Sen J, Groenewald C, Hiscott PS, Smith PA, Damato BE. Transretinal choroidal tumor biopsy with a 25-Gauge vitrector. *Ophthalmology* 2006; 113: 1028-1031.
22. Akgul H, Otterbach F, Bornfeld N, Jurklies B. Intraocular biopsy using special forceps: A new instrument and refined surgical technique. *Br J Ophthalmol* 2011; 95(1): 79-82.
23. Caminal JM, Sanz S, Carreras M, et al. Epibulbar seeding at the site of a transvitreal fine-needle aspiration biopsy. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(4): 587-9.
24. Bagger M, Smidt-Nielsen I, Andersen MK, Jensen PK, Heegaard S, Andersen KK. Long-term metastatic risk after biopsy of posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 2018; 125(12): 1969-1976.
25. Medina CA, Biscotti CV, Singh N, Singh AD. Diagnostic cytologic features of uveal melanoma. *Ophthalmology* 2015; 122: 1580-584.
26. Seddon JM, Albert DM, Lavin PT, Robinson N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1983; 101(12): 1894-9.
27. Silva-Rodriguez P, Bande M, Fernandez-Diaz D, Lago-Baameiro N, Pardo M, Blanco-Teijeiro MJ, et al. Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish patient cohort. *Acta Ophthalmologica* 2021; 99(7): e1077-e1089.
28. Shields CL, Say EM, Hasanreisoglu M, Saktanasate J, Lawson BM, Landy JE, et al. Cytogenetic abnormalities in uveal melanoma based on tumor features and size in 1059 patients. The 2016 W. Richard Green Lecture. *Ophthalmology* 2017; 124: 609-618.
29. Reichstein D. New concepts in the molecular understanding of uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2017; 28: 219-227.
30. Robertson AG, Shih J, Yau C, Gibb EA, Oba J, Mungall KL, et al. Integrative analysis identifies four molecular and clinical subsets in uveal melanoma. *Cancer Cell* 2017; 32: 204-20.e15.
31. Shields CL, Mayro EL, Bas Z, Dockery PW, Yaghy A, Lally SE, et al. Ten-year outcomes of uveal melanoma based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) classification in 1001 cases. *Indian J Ophthalmol* 2021; 69: 1839-45.
32. Decatur CL, Ong E, Garg N, Anbunathan H, Bowcock AM, Field MG, et al. Driver Mutations in Uveal Melanoma: Associations With Gene Expression Profile and Patient Outcomes. *JAMA Ophthalmol* 2016; 134(7): 728-733.
33. Onken MD, Worley LA, Harbour JW. Association between gene expression profile, proliferation and metastasis in uveal melanoma. *Curr Eye Res* 2010; 35(9): 857-63.
34. Harbour JW. Genomic, Prognostic, and Cell-Signaling Advances in Uveal Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013: 388-391.
35. Scheffler AC, Koca E, Bernicker EH, Correa ZM. Relationship between clinical features, GEP class, and PRAME expression in uveal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2019; 257: 1541-1545.
36. Field MG, Decatur C, Kurtenbach S, Gezgin G, van der Velden PA, Jager MJ, et al. PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2016; 22(5): 1234-1242.
37. Shields JA, Shields CL, Ehya H, Eagle Jr RC, De Potter P. Fine-needle aspiration biopsy of suspected intraocular tumors: the 1992 Urwick lecture. *Ophthalmology* 1993; 100: 1677-1684.
38. Caracterización patobiológica del melanoma uveal. Matilla Roderó, María. Universidad de Málaga. Tesis Doctoral 2003.