



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

22
24

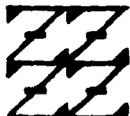
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

FALLA DE ORIGEN

DETECCION DE MUTACIONES EN PACIENTES
CON RETINOBLASTOMA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
M I G U E L M A C I A S V E G A

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HERRERO S. DE
DE INVESTIGACION

DIRECTOR: DRA. LORENA OROZCO O.
ASESOR: DRA. ISABEL SOTO C.

MEXICO, D. F.

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

En especial al Dr. Antonio Salazar del INP, por su valiosa colaboración, ya que sin ella no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Lorena Orozco, por su confianza, paciencia y constante apoyo brindados para lograr, bajo su dirección, la realización de esta tesis.

A las Dras. Alessandra Carnevale y Victoria del Castillo por darme la oportunidad de iniciar el desempeño profesional de mi carrera.

Al Biol. Manuel Moreno por su valiosa colaboración y por el entusiasmo brindados durante el desarrollo de esta tesis.

A la Biol. Margarita Chavez, Dra. Teresa Villarreal, Q.F.B Yolanda Soldaña, Dr. Miguel Angel Alcantara y Biol. David Cruz por su constante apoyo y compañerismo.

A la Tèc. Araceli Romero por su valiosa colaboración en el desempeño diario del laboratorio de Biología Molecular del INP.

Al Instituto Nacional de Pediatría (INP) por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de investigadores.

DEDICATORIAS

Como una muestra de agradecimiento, dedico esta tesis:

A mis padres, Miguel Maclas y Amalia Vega, a quienes espero na haber defraudado, por su confianza y el apoyo que siempre me han brindado.

A todos los maestros (as) que intervinieron en mi formación académica.

A la facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autonoma de México por darme la oportunidad de superarme académicamente.

A mis colegas Biólogos como un aliciente para sus futuros logros.

En especial a todos aquellos enfermos que diariamente depositan su confianza y apoyo incondicional para el desarrollo de nuevas tecnologías y generación de conocimientos encaminados, a brindar mejores perspectivas de salud y una mejor calidad de vida.

INDICE

	<i>Pag.</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>Introducción</i>	<i>3</i>
<i>Antecedentes</i>	<i>15</i>
<i>Justificación</i>	<i>23</i>
<i>Objetivos</i>	<i>24</i>
<i>Material y Métodos</i>	<i>25</i>
<i>Diagrama de flujo</i>	<i>26</i>
<i>Metodología</i>	<i>27</i>
- <i>Criterios de inclusión</i>	<i>27</i>
- <i>Criterios de exclusión</i>	<i>27</i>
- <i>Extracción de DNA de sangre periférica</i>	<i>27</i>
- <i>Purificación del DNA</i>	<i>27</i>
- <i>Cuantificación del DNA</i>	<i>28</i>
- <i>Síntesis de oligonucleótidos</i>	<i>31</i>
- <i>Amplificación por PCR</i>	<i>36</i>
- <i>Detección de mutaciones por análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).</i>	<i>41</i>
- <i>Estandarización de la técnica de secuenciación</i>	<i>44</i>
<i>Resultados</i>	<i>48</i>
- <i>Hallazgos clínicos</i>	<i>48</i>
- <i>Creación de un banco de DNA</i>	<i>53</i>
- <i>Detección de mutaciones por PCR y SSCP</i>	<i>55</i>
- <i>Detección de mutaciones en pacientes con retinoblastoma</i>	<i>57</i>
<i>Discusión</i>	<i>76</i>
<i>Conclusiones</i>	<i>82</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>83</i>
<i>Apendice 1</i>	<i>88</i>
<i>Apendice 2</i>	<i>89</i>

INDICE DE TABLAS

<i>TABLA</i>	<i>pag.</i>
<i>1.- CARACTERISTICAS DEL RETINOBLASTOMA</i>	<i>4</i>
<i>2.- CONDICIONES PARA PCR</i>	<i>37</i>
<i>3.- CONDICIONES PARA SSCP</i>	<i>42</i>
<i>4.- DATOS OCULARES EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA</i>	<i>49</i>
<i>5.- EDAD DE INICIO DEL PADECIMIENTO</i>	<i>50</i>
<i>6.- POBLACION DE ESTUDIO</i>	<i>52</i>
<i>7.- BANCO DE DNA</i>	<i>54</i>
<i>8.- POBLACION AFECTADA CON RB BILATERAL</i>	<i>58</i>
<i>9.- POBLACION AFECTADA CON RB UNILATERAL</i>	<i>59</i>

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>pag.</i>
1.- <i>RB hereditario</i>	5
2.- <i>RB no hereditario</i>	6
3.- <i>Caso de no penetrancia</i>	7
4.- <i>Teoría de Knudson</i>	8
5.- <i>Ubicación del gen RB en el cromosoma 13</i>	10
6.- <i>Gen del retinoblastoma</i>	11
7.- <i>Estructura de la proteína pRB</i>	13
8.- <i>Función de la pRB en el ciclo celular</i>	14
9.- <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	17
10.- <i>Detección de polimorfismos por SSCP</i>	19
11.- <i>Secuenciación de Sanger</i>	22
12.- <i>Integridad del DNA</i>	30
13.- <i>Síntesis de oligonucleótidos</i>	34
14.- <i>Fases de síntesis de oligonucleótidos</i>	35
15.- <i>Amplificación del exón 3</i>	38
16.- <i>Amplificación del exón 4</i>	39
17.- <i>Amplificación del exón 5</i>	40
18.- <i>Autorradiografía de secuenciación</i>	47
19.- <i>SSCP del gen FQ con una mutación puntual</i>	56
20.- <i>Caso RB272</i>	60
21.- <i>Caso RB103</i>	61
22.- <i>Casos RB175 y RB267</i>	62
23.- <i>Casos RB289 y RB28</i>	63
24.- <i>Caso RB351</i>	64
25.- <i>Caso RB333</i>	65
26.- <i>Caso RB242</i>	66
27.- <i>Caso RB164</i>	67
28.- <i>Caso RB115</i>	68
29.- <i>Densitometría del caso RB289</i>	69
30.- <i>Densitometría del caso RB28</i>	70
31.- <i>Densitometría del control normal</i>	71
32.- <i>Patrón normal de SSCP para el exón 3</i>	73
33.- <i>Patrón normal de SSCP para el exón 4</i>	74
34.- <i>Patrón normal de SSCP para el exón 5</i>	75

RESUMEN

El retinoblastoma (RB) es una neoplasia maligna de origen embrionario con una frecuencia de 1 en 20,000 nacidos vivos. El 40 % de los casos son hereditarios y el tumor generalmente es bilateral, aunque el 10-15% de los RB unilaterales también son hereditarios. El resto de los casos presentan la forma no hereditaria y el tumor siempre es unilateral. Esta neoplasia se hereda con un patrón autosómico dominante y tiene una penetrancia del 90 %, es decir el 10 % de los individuos que portan una mutación en el gen RB no desarrollan el retinoblastoma pero pueden heredar el gen anormal a su descendencia. El gen del retinoblastoma se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14), contiene 27 exones y codifica para una fosfoproteína nuclear (pRB) que participa en la regulación del ciclo celular como un inhibidor de la proliferación celular y como supresor de la tumorigénesis, de tal manera que la inactivación del gen RB es la responsable del desarrollo del tumor. Los pacientes con RB hereditario tienen una predisposición mayor a desarrollar otros tipos de cáncer como osteosarcoma, fibrosarcoma y diversos mielomas, entre otros. Clínicamente, el RB unilateral hereditario y el no hereditario son indistinguibles por lo que es fundamental la identificación de las mutaciones que permitan el diagnóstico diferencial entre ambas formas. Por otro lado, en la actualidad el diagnóstico de la enfermedad se establece en etapas avanzadas en las que se requieren tratamientos agresivos como la enucleación del órgano afectado. Por tanto, es fundamental el diagnóstico temprano para un tratamiento oportuno y la identificación de las mutaciones para diferenciar el RB hereditario del no hereditario y proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

El objetivo general de este trabajo fue detectar las mutaciones responsables del retinoblastoma en pacientes mexicanos. Para esto se creó un banco de DNA de 40 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de retinoblastoma y de sus familiares de primer grado. También se implementaron y estandarizaron las metodologías que permitieron detectar las mutaciones en el gen RB. Se sintetizaron las

secuencias de oligonucleótidos necesarios para amplificar los exones 3, 4 y 5 del gen RB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla del DNA (SSCP) y se estandarizaron las condiciones óptimas para realizar la secuenciación del DNA. De los 40 pacientes se encontraron 6 casos con RB bilateral y 5 casos con RB unilateral que mostraron un patrón electroforético anormal por SSCP. Para establecer si los cambios electroforéticos se heredaron de los padres (casos de no penetrancia) se estudió un grupo de padres de los pacientes con patrones anormales y todos presentaron un patrón electroforético normal, lo cual sugiere que el cambio electroforético encontrado en los pacientes es ocasionado por una mutación de novo, y que los casos con RB unilateral y un patrón electroforético alterado son hereditarios.

Con estos resultados se demostró que el análisis por SSCP puede emplearse eficientemente para localizar las mutaciones responsables de las enfermedades hereditarias y de diferentes formas de cáncer.

Un diagnóstico molecular temprano es de gran utilidad para el tratamiento oportuno y el asesoramiento genético adecuado de los individuos afectados, además permite detectar los casos de no penetrancia. Este trabajo abre una nueva línea de investigación para el estudio del retinoblastoma donde se determinen los tipos de mutaciones, los casos de novo, de no penetrancia y también donde se establezca el diagnóstico diferencial entre el RB hereditario y el RB no hereditario.

INTRODUCCION

El retinoblastoma (RB) es una neoplasia maligna de origen embrionario que se presenta generalmente antes de los cinco años de edad (Wiggs y cols, 1988; Shimizu y cols, 1994). A nivel mundial se estima que tiene una frecuencia de 1 en 20,000 nacidos vivos (Gallie y Joremy, 1990; Blanquet y cols, 1994). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de leucocoria, estrabismo y posteriormente por signos inflamatorios oculares (Díaz y Orozco, 1992). Se puede presentar en forma unilateral o bilateral; todos los bilaterales y el 10-15% de los unilaterales son hereditarios (*tabla 1*) y en su mayoría son mutaciones *de novo* (*fig. 1*). El RB no hereditario ocurre en el 60% de los casos, el tumor siempre es unilateral y se manifiesta más tardíamente que el hereditario (*fig. 2*) (Cowell, 1991). La predisposición para desarrollar tumores se hereda con un patrón autosómico dominante y una penetrancia del 90% (*fig. 3*) (Abramson, 1990; Jorgen y cols, 1990; Scheffer y cols, 1989).

De acuerdo con la teoría de Knudson, el RB es un cáncer causado por dos eventos mutacionales (*fig. 4*), como resultado de los cuales ambos alelos del gen responsable del RB se inactivan y conducen al desarrollo de la neoplasia. En el RB hereditario la inactivación del primer alelo ocurre en las células germinales mientras que la inactivación del segundo se presenta sólo en las células de la retina; en el RB no hereditario ambas mutaciones ocurren en las células de la retina (Knudson, 1971). Cuando ambos alelos se inactivan se dice que existe pérdida de heterocigocidad (LOH) y que la homocigocidad resultante es causa del desarrollo del tumor (Naumova y Sapienza, 1994; Weinber, 1991).

TABLA 1.- CARACTERISTICAS DEL RETINOBLASTOMA

<u>HEREDITARIO¹</u>	<u>NO HEREDITARIO²</u>
Inicio temprano (< 1 año)	Inicio tardío (> 1 año)
Bilateral (85-90%) Unilateral (10-15%)	Unilateral (100%)
Alteraciones genéticas : Translocaciones, grandes deleciones y mutaciones puntuales	Alteraciones genéticas : Translocaciones, grandes deleciones y mutaciones puntuales
1 ^{er} evento mutacional en células germinales (de novo)	1 ^{er} evento mutacional en las células de la retina
Progenie afectada	Progenie normal
Alto riesgo de otras neoplasias	Sin riesgo de otras neoplasias

(Díaz y Orozco, 1992)

¹ El 40 % de los casos con RB son hereditarios.

² El 60% de los casos con RB son no hereditarios.

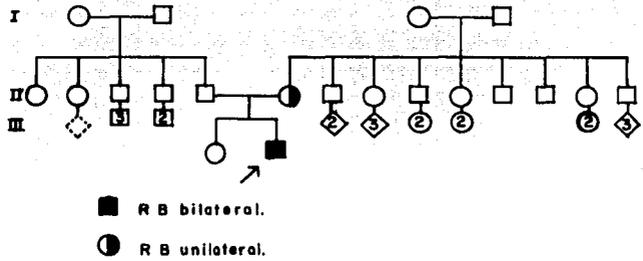


Figura 1.- RB hereditario; árbol genealógico de un caso con RB bilateral cuya madre está afectada con RB unilateral.

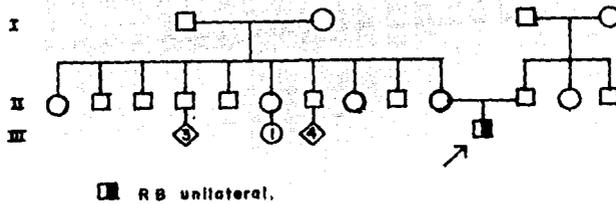


Figura 2.- RB no hereditario; árbol genealógico de un caso con RB unilateral sin antecedentes de la enfermedad, clínicamente no se puede distinguir el RB unilateral hereditario del no hereditario.

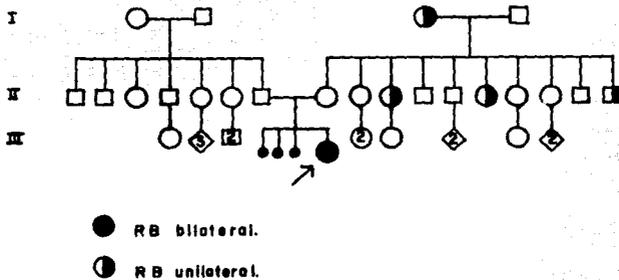
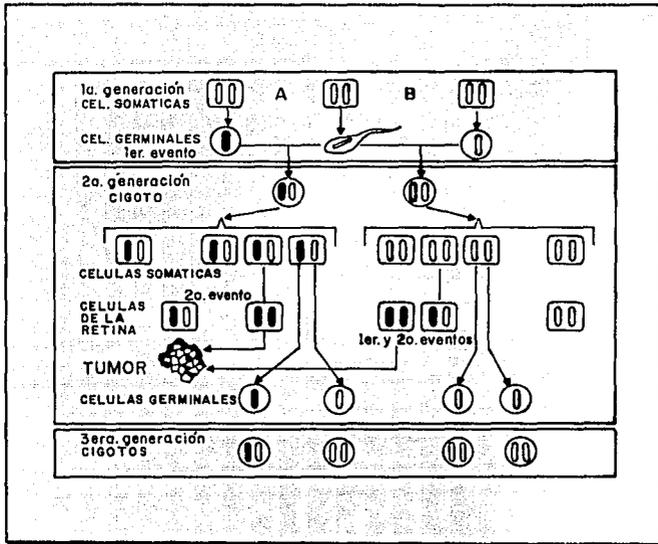


Figura 3.- Caso de no penetrancia; caso de un paciente con RB bilateral cuya madre procede de una familia donde hay varios individuos afectados con RB unilateral, la madre del paciente es un caso de no penetrancia que heredó a su hija el alelo mutado proveniente desde la Iª generación.



(Díaz y Orozco; 1992)

Figura 4.- TEORIA DE KNUDSON. De acuerdo con la hipótesis de Knudson, el retinoblastoma es causado por la inactivación de ambos alelos del gen RB; en la forma hereditaria, el primer alelo se inactiva en las células germinales y el segundo alelo se inactiva en las células de la retina (A) y en la forma no hereditaria los dos alelos se inactivan únicamente en las células de la retina (B).

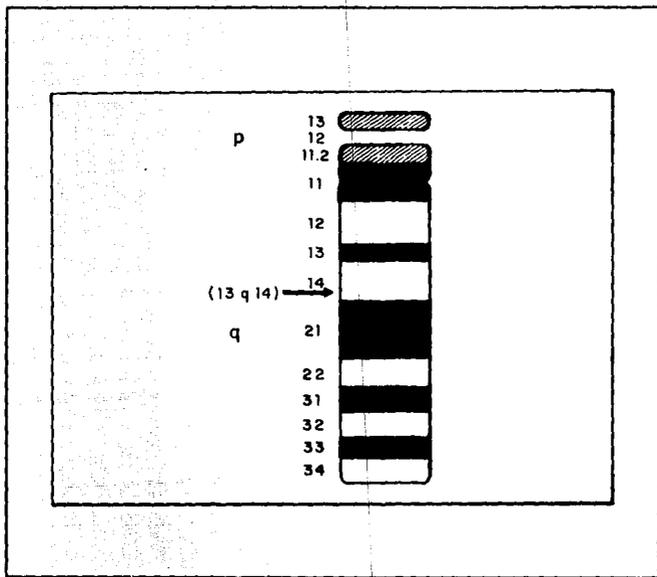
Existen cuatro mecanismos que causan LOH (Gallie y Joremy, 1990):

- a) pérdida de un cromosoma
- b) pérdida de un cromosoma y reduplicación del cromosoma restante.
- c) recombinación mitótica y,
- d) mutación *de novo* en el cromosoma homólogo.

El cuidadoso análisis por fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's) del cromosoma 13, reveló que la recombinación mitótica es el mecanismo más común de la LOH (Weatherall, 1991; Greger y cols, 1990).

GENETICA MOLECULAR DEL GEN RB

El gen RB se localiza en la banda 14 del brazo largo del cromosoma 13 (13q14) (fig. 5). Tiene una longitud de 200 kb, contiene 27 exones (fig. 6), se transcribe en un mRNA de 4.7 kb (Dunn y cols, 1988; Mitchell y Cowell, 1988; McGee y cols, 1989) y codifica para una fosfoproteína nuclear (pRB) de 928 aminoácidos y un peso molecular de 110 KDa (Friend y cols, 1986; Dryja y Rapaport, 1986; Fung y Murphree, 1987). Para la clonación del gen RB, Friend y Horowitz (1987) construyeron una genoteca de cDNA a partir del mRNA de una línea celular de retina humana usando como vector de clonación el bacteriofago λ gt-11. Estos autores formaron un híbrido con líneas celulares de ratón y humano y obtuvieron varias clonas de cDNA con mapas físicos similares que en 1988 fueron utilizados por Huci y cols (1988) para transformar líneas celulares malignas obteniendo células capaces de sintetizar la fosfoproteína normal.

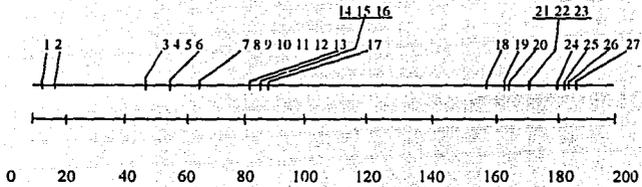


(Díaz y Orozco; 1992)

Figura 5.- UBICACION DEL GEN RB EN EL CROMOSOMA 13.
 Esquema del cromosoma 13 con la técnica de bandas G. La flecha indica el locus del gen RB en la región cromosómica 13q14.

GEN DEL RETINOBLASTOMA

EXONES

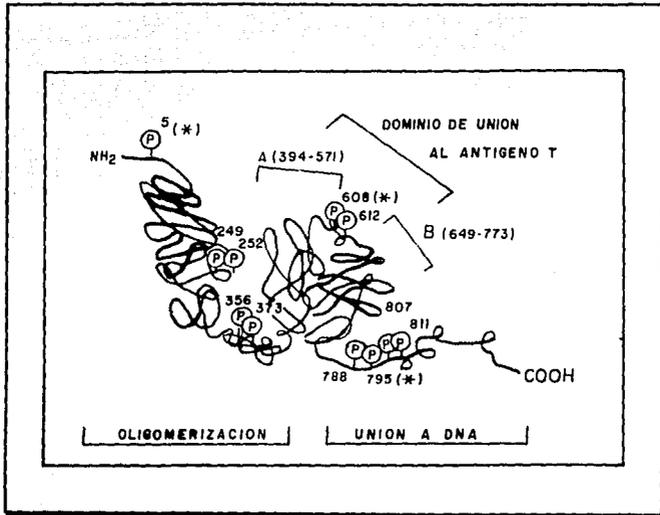


Kilobases de DNA

Figura 6.- El gen RB contiene 27 exones y comprende 200 kb (Yandell y Dryja, 1989)

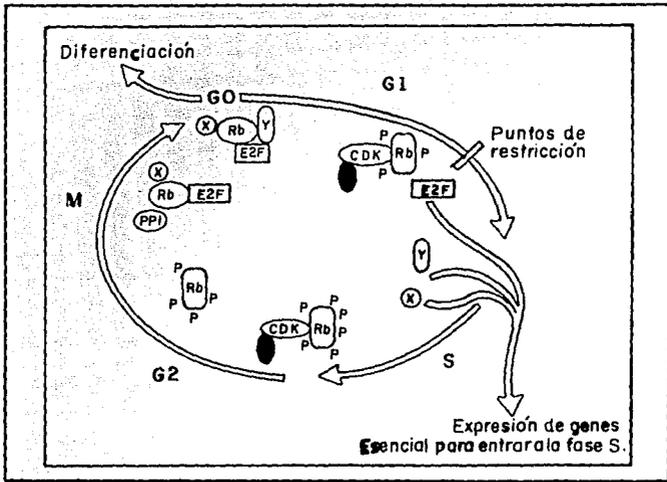
MECANISMO DE ACCION DE LA pRB

La fosfoproteína pRB (fig. 7) se une de manera específica al factor de transcripción *E2F* y su fosforilación está regulada por proteínasas, siendo la más importante la *cdc2*. Esta cinasa es un regulador universal de la división celular en eucariotes y puede fosforilar a la pRB *in vitro* y al menos a cinco de los diez o más residuos de serinas y treoninas *in vivo*. La pRB en su forma no fosforilada se une al factor de transcripción *E2F* durante la fase G1 (fig. 8). El mismo factor se une a ciclina A durante la fase S. Tanto la ciclina A como la pRB participan en la regulación del ciclo celular, la pRB como un regulador negativo y la ciclina A como un regulador positivo. La ciclina A se sintetiza al final de la fase G1 y se degrada en la prometafase; su función es promover la replicación del DNA (Shirodkar y cols, 1992). Un mecanismo a través del cual ambos ejercen sus funciones parece ser la formación de complejos con el factor de transcripción por medio del cual modulan potencialmente su actividad. Otros blancos de regulación transcripcional negativa de la pRB son *tgf-31*, *c-fos* y *c-myc*. Tanto *c-fos* como *c-myc* tienen sitios de unión para *E2F* en sus promotores implicando que la pRB suprime la transcripción de estos genes al secuestrar al factor de transcripción *E2F* en un complejo inactivo. La proteína pRB cuenta con un dominio de oligomerización para unirse a otras unidades de ella misma y un dominio de unión al DNA, además de contar en su estructura con sitios de unión para el factor *E2F* tiene sitios de unión que le permiten asociarse con oncoproteínas virales como la E1A, antígeno T y proteínas de transformación del adenovirus E2, de tal manera que estos virus pueden inactivar a la pRB y dar lugar a un crecimiento celular no controlado (Huei y cols, 1988; Ludlow y cols, 1989). En los retinoblastos y en otras células susceptibles a transformación la inactivación del gen RB es suficiente para permitir el crecimiento sin control de las células (Benedict y cols, 1990).



(Hollingsworth y cols, 1993)

Figura 7.- ESTRUCTURA DE LA PROTEINA pRB. La proteína humana pRB contiene al menos tres dominios estructurales. Uno de ellos incluye al extremo amino terminal y los otros dos incluyen los dominios requeridos para unirse a las oncoproteínas de varios virus de DNA como por ejemplo, el antígeno T. Los dominios de unión para el antígeno T se requieren también para su asociación con el factor E2F. Los sitios potenciales para la fosforilación por cdc2 están indicados por (p) y los sitios que no pueden ser fosforilados *in vivo* por (*) . Los números indican la secuencia de aminoácidos.



(Hollingsworth y cols, 1993)

Figura 8.- FUNCIÓN DE LA pRB EN EL CICLO CELULAR. La pRB y el ciclo de división celular. En este esquema, la proteína pRB está representada por RB en las diferentes fases del ciclo celular. Las etapas de fosforilación se indican por P. X y Y representan proteínas celulares que se asocian con RB, y ciclinas (óvalos sombreados) así como también las subunidades catalíticas de la proteinfosfatasa tipo 1 (PP1). Durante G0 y principios de G1, la RB está fosforilada y se une a cierto número de proteínas, incluyendo el factor de transcripción E2F. La asociación con un complejo de ciclinas (CDK) dependientes de cinasas, conduce a la fosforilación de la RB y probablemente están involucradas diferentes cinasas (CDK) en diferentes etapas del ciclo celular. Finalmente, la fosforilación induce a la disociación de las proteínas unidas a la RB; las proteínas X, Y se separan de la fosfoproteína RB en la etapa del ciclo celular denominada como puntos de restricción para cumplir cada una con su función en la transcripción de otro tipo de genes

ANTECEDENTES

Neoplasias asociadas

Los pacientes con retinoblastoma hereditario tienen mayor predisposición para desarrollar tumores secundarios de tipo no ocular. Originalmente se pensó que los tumores secundarios eran el resultado del tratamiento con radioterapia, debido a que la mayoría de ellos aparecen en la zona radiada de pacientes con la mutación germinal; sin embargo un buen número de niños afectados desarrollan tumores secundarios antes del tratamiento del tumor intraocular. Estos tumores se pueden presentar también en sitios distantes a la zona radiada como ocurre con el tejido óseo. Se ha visto también que más del 50% de niños con retinoblastoma hereditario desarrollan tumores secundarios no oculares en los siguientes 32 años y más del 90% de los niños que reciben radioterapia los desarrollan en los 30 años siguientes al tratamiento (Abramson, 1990). Por otro lado los individuos con retinoblastoma hereditario tienen un riesgo 200 veces más elevado de desarrollar tumores de tipo mesenquimatoso en etapas tempranas de su vida adulta, siendo los más frecuentes los osteosarcomas, fibrosarcomas y mielomas (Roarty y cols, 1988; Draper y cols, 1986; Toguchida y cols, 1988). Desafortunadamente en la actualidad en México, el diagnóstico del retinoblastoma se establece ya en etapas avanzadas. Los casos diagnósticos de esta manera requieren de tratamientos agresivos que incluyen la enucleación del ojo afectado.

Nuevas estrategias para el estudio del RB

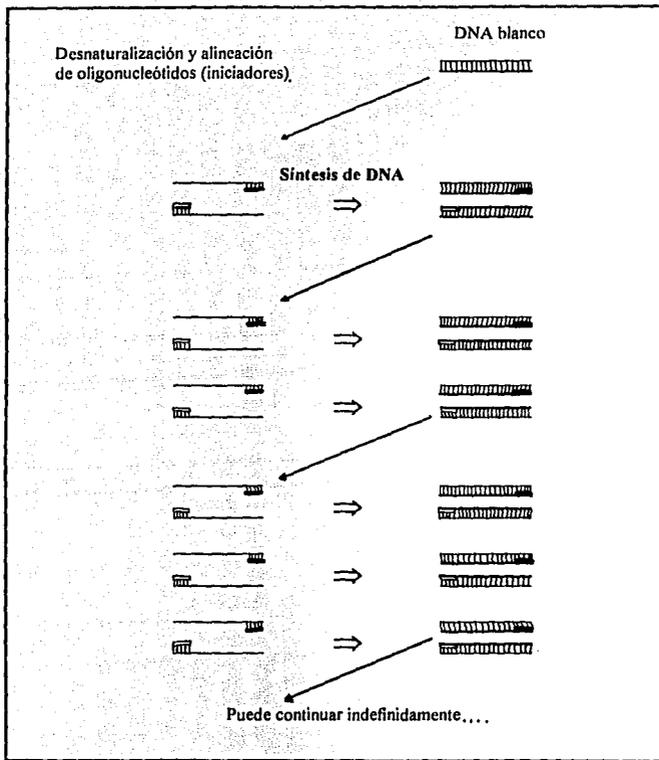
Con el antecedente previo de que en 1989, Orita y cols (1989) desarrollaron un método denominado polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) donde las moléculas de DNA de una sola cadena toman una

conformación dependiente de su secuencia nucleotídica, y cualquier tipo de mutación incluyendo una mutación puntual puede alterar la conformación de la cadena y detectarse electroforéticamente. Aunado al hecho de que las mutaciones se distribuyen a todo lo largo del gen RB y que no existen zonas específicas del gen que estén involucradas con el desarrollo del tumor (Blanquet y cols, 1994), se planteó en el presente trabajo establecer metodologías moleculares como la PCR, SSCP y secuenciación del DNA para la detección de las mutaciones responsables del retinoblastoma.

ANALISIS POR PCR

Fundamento

Con esta técnica se puede amplificar selectivamente una sola molécula de DNA o RNA en varios millones de veces en pocas horas. Permite la detección y el análisis de secuencias específicas de un gen a partir de la muestra de un paciente sin necesidad de su clonación, Southern blot o Northern blot. La PCR está basada en la amplificación enzimática de un fragmento de DNA que es flanqueado por dos secuencias cortas de DNA (oligonucleótidos) que hibridan con la cadena homóloga y sirven de iniciadores para la síntesis de la cadena complementaria por la DNA polimerasa (*fig. 9*). Con el uso de máquinas especializadas para PCR en pocas horas se pueden generar millones de copias idénticas a esta secuencia. Esta técnica requiere sólo cerca del 1% del DNA requerido para Southern blot. Los productos amplificados son fácilmente analizables en estas condiciones, lo que facilita la detección de mutaciones. La PCR también puede aplicarse al análisis de pequeñas muestras de RNA, sintetizando primero un DNA complementario (cDNA) a partir del RNA utilizando la transcriptasa reversa (Orozco, 1993).



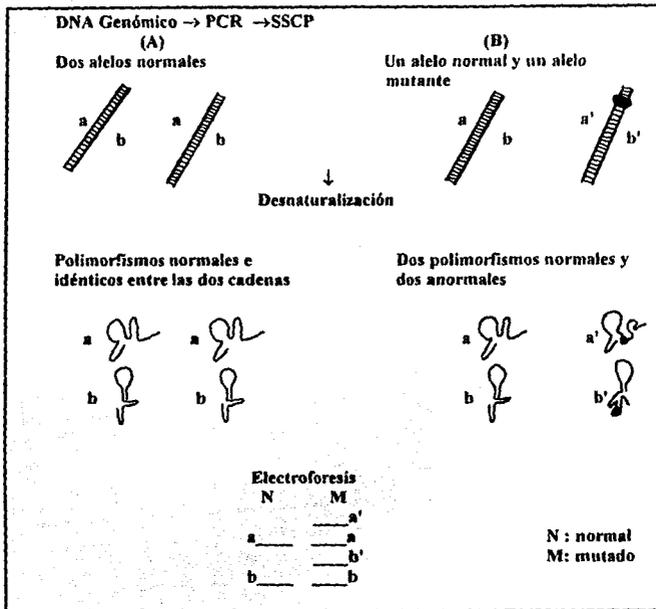
(Orozco, 1993)

Figura 9.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR. La técnica de PCR permite obtener millones de copias de un pequeño fragmento de DNA en forma exponencial en un periodo de tiempo relativamente corto.

DETECCION DE MUTACIONES POR ANALISIS DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (SSCP)

Fundamento

Orita y cols. (1989) aplicaron el método de SSCP para detectar polimorfismos en la secuencia de nucleótidos del DNA humano y pudieron observar la diferencia en la movilidad de cadenas sencillas de DNA empleando una secuencia escogida arbitrariamente. Por este procedimiento los DNA's de cadena sencilla de la misma longitud pueden separarse con una electroforesis en gel de poliacrilamida debido a la diferencia en sus conformaciones predominantemente semiestables. La diferencia en la movilidad de los DNA's de cadena sencilla sobre un gel de electroforesis se debe a los cambios conformacionales y por lo tanto son denominados como polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) (Poduslo y cols, 1991; Metka y cols, 1994), (*Fig. 10*). El análisis por SSCP puede ser empleado para la búsqueda de mutaciones involucrados en enfermedades hereditarias y para detectar aberraciones en el DNA en los diferentes tipos de cáncer (Damjan y Dean, 1993). La comparación de fragmentos de DNA de porciones de tejido canceroso con aquellos de tejido normal por medio de SSCP puede revelar alelos amplificados de determinados genes y pérdida de heterocigocidad (LOH) en los loci de un cromosoma cualquiera que éste sea. Una remarcada ventaja del análisis por SSCP es que puede ser empleado para detectar mutaciones puntuales en varias posiciones de un fragmento de DNA (Damjan y Dean, 1995; Iwahana y cols, 1989).



(Damjan y Dean, 1994)

Figura 10.- DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS POR SSCP. La técnica de SSCP se basa en el principio de que las moléculas de DNA al desnaturalizarse toman una conformación que depende de su secuencia de bases. Las moléculas que difieren desde 1 hasta 1,000 pares de bases pueden adoptar diferentes conformeros y migrar en forma diferente en geles de poliacrilamida. En la figura se observan dos alelos (A) con sus dos cadenas normales (a y b), y otro par de alelos (B) donde uno de ellos tiene sus dos cadenas normales (a y b) y el otro tiene mutadas ambas cadenas (a' y b'), las cadenas mutantes adquieren un polimorfismo anormal y migran en forma diferente en una electroforesis.

SECUENCIACION POR EL METODO DE SANGER

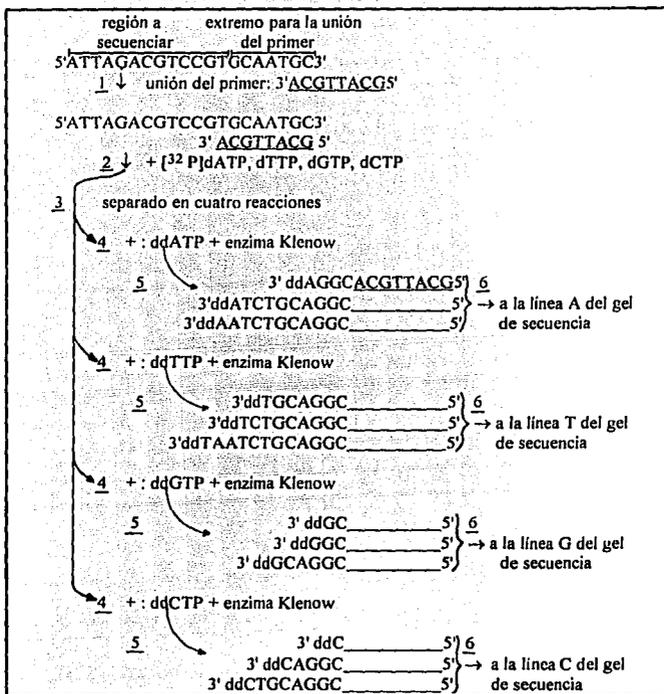
Fundamento

Originalmente F. Sanger y cols (1977) desarrolló un método de secuenciación utilizando DNA de *Escherichia coli* y DNA polimerasa I para sintetizar una copia complementaria de un templete de DNA de cadena sencilla. Este método aprovecha la capacidad de la DNA polimerasa I de *E. coli* para utilizar como sustratos a los 2',3'- dideoxynucleótidos. Cuando un dideoxynucleótido se incorpora al extremo 3' de la cadena en crecimiento, la elongación de dicha cadena se detiene selectivamente en la base correspondiente Guanina, Adenina, Timina o Citocina (G,A,T,C) debido a que la cadena en crecimiento pierde ahora un grupo 3'-hidroxilo. En la práctica, el procedimiento de Sanger involucra los siguientes pasos (fig. 11):

- 1.- El DNA que se va a secuenciar debe ser de cadena sencilla. Este servirá como molde a la DNA polimerasa I.
- 2.- Un oligodeoxynucleótido complementario sintetizado químicamente (iniciador) se alinea al extremo 3' de la región que se va a secuenciar del moldetemplete de DNA de cadena sencilla. Este servirá como iniciador para la DNA polimerasa I.
- 3.- El complemento formado por el DNA molde y el iniciador se divide en cuatro alícuotas y cada una de ellas será una reacción independiente. Se utiliza la polimerasa Klenow para sintetizar un oligodeoxynucleótido marcado radiativamente que es complementario al DNA que se pretende secuenciar. Cada una de las cuatro reacciones independientes contiene los cuatro desoxynucleótidos (uno de ellos o más pueden estar marcados radiativamente), y uno de los cuatro 2',3'- dideoxynucleótidos. El crecimiento de la cadena en formación se detiene en el momento en el cual es incorporado el dideoxynucleótido correspondiente (ddA, ddG, ddC o

ddT) a la reacción de crecimiento. De esta manera cada una de las cuatro reacciones independientes contiene un extremo 5' fijo determinado por el iniciador acoplado a ella y un extremo 3' terminal con una base específica.

4.- Cuando terminan las reacciones de crecimiento las copias radiactivas que se obtienen se separan del templado de DNA por calentamiento y se corren en un gel desnaturalizante de secuenciación. Las cuatro reacciones de crecimiento independientes se corren en carriles adyacentes sobre el gel, y la secuencia del DNA se puede leer entonces directamente en una autorradiografía del gel (Sanger y cols, 1977).



(Ausubel y Brent, 1988)

Figura 11.- SECUENCIACION DE SANGER. El fragmento de DNA que se secuencia es acoplado con un oligodeoxinucleótido que sirve como iniciador para la DNA-polimerasa (1). Se agregan los cuatro deoxinucleótidos uno de los cuales está marcado radiactivamente (2) y la reacción se divide en cuatro alícuotas (3). Se agregan la DNA-polimerasa y los dideoxinucleótidos ddATP, ddTTP, ddGTP o ddCTP (4) y se permite que transcurra la reacción (5). Finalmente se detiene la reacción y se colocan en carriles adyacentes sobre el gel de secuenciación (6).

JUSTIFICACION

El Instituto Nacional de Pediatría (INP) recibe aproximadamente 10 casos de RB al año; un gran número de ellos inician sus manifestaciones clínicas antes del año de edad (Díaz y Orozco, 1992). Por lo general, el tumor se observa en las etapas iniciales sólo cuando se le busca, como en los niños que tienen antecedentes hereditarios, o cuando ya se ha afectado un ojo. Cuanto más pronto se efectúe el descubrimiento y el tratamiento del tumor, la oportunidad de impedir la diseminación a través del nervio óptico y de los tejidos de la órbita es mayor (Vaughan y Taylor, 1987). Desafortunadamente en nuestro país el 100% de los casos han requerido de la enucleación de por lo menos un ojo por falta de un diagnóstico temprano. Por lo mencionado anteriormente, es imprescindible aplicar los métodos de Biología Molecular para con ello contribuir a la prevención y a un tratamiento oportuno de los pacientes afectados.

OBJETIVO GENERAL

Detección de las mutaciones en el gen RB responsables del retinoblastoma en pacientes mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Crear un banco de DNA de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de retinoblastoma.
- 2.- Implementar y estandarizar las metodologías que permitan detectar las mutaciones en el gen RB.
- 3.- Contribuir al diagnóstico diferencial entre el RB hereditario y no hereditario.

MATERIAL Y METODOS

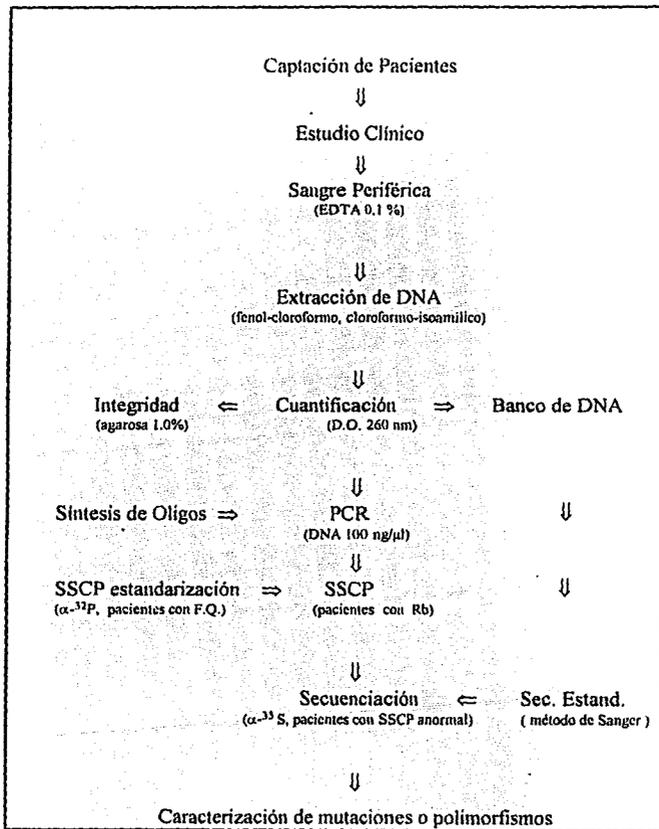
ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir con el objetivo de este trabajo se captó (*ver diagrama de flujo*) una población de 40 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de RB. De acuerdo con el estudio clínico de los pacientes, se seleccionaron aquéllos que no hubiesen sido transfundidos, ni hubiesen recibido quimio ni radioterapia en los últimos tres meses anteriores al estudio. Se tomó una muestra de sangre periférica de los pacientes seleccionados y de sus familiares de primer grado, se extrajo y se cuantificó el DNA los linfocitos de cada paciente y con el se conformó un banco de DNA.

De acuerdo con Blanquet y cols (1993), se sintetizaron las secuencias de oligonucleótidos necesarios para amplificar los exones 3, 4 y 5 del gen RB de 28 pacientes con RB unilateral y 12 con RB bilateral, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se estandarizó la técnica para el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) empleando como control las condiciones aplicadas en la detección de una mutación conocida causante de la fibrosis quística, y después se aplicó esta técnica para detectar polimorfismos anormales en los pacientes afectados con retinoblastoma. Finalmente se estandarizó el proceso de secuenciación del DNA de Sanger y cols., (1977) para caracterizar las mutaciones detectadas en la población de estudio.

Los reactivos y soluciones empleadas en este trabajo se describen en el Apéndice 2.

DIAGRAMA DE FLUJO



METODOLOGIA

Criterios de inclusión:

Se incluyeron en el estudio 40 casos índice, 28 con RB unilateral y 12 con RB bilateral cuyo diagnóstico clínico de RB fue confirmado por estudios histopatológicos (todos los casos fueron confirmados por un sólo patólogo).

Criterios de exclusión:

Se excluyeron aquellos pacientes que hubiesen recibido tratamiento con quimio o radioterapia en los tres meses anteriores al estudio.

El DNA se obtuvo a partir de sangre periférica de acuerdo con el siguiente procedimiento (Ausubel y Brent, 1988)

EXTRACCION DE DNA DE SANGRE PERIFERICA

Se tomaron 7 ml de sangre periférica del paciente usando EDTA como anticoagulante y después se centrifugó la muestra por 20 minutos a 3,000 rpm, se tomó la capa de linfocitos, se colocó en 3 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se desechó el plasma y los eritrocitos, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm.

.- Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 3 ml de RCBL, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm se repitió este paso hasta eliminar toda la hemoglobina finalmente, se resuspendió el botón de linfocitos en 333 µl de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de linfocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42 °C para obtener un hidrolizado de linfocitos.

PURIFICACION DEL DNA

Se purificó el DNA contenido en el hidrolizado de la siguiente manera:

.- Se agregó al hidrolizado obtenido en el paso anterior 2 ml de fenol, se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm,

después se pasó la fase superior a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió una vez más el paso anterior. Se pasó la fase superior a un tubo limpio y se agregó 1 ml de fenol y 1 ml de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm, la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior por segunda vez.

.- La fase superior se pasó a un tubo limpio y se agregaron 2 ml de cloroformo/isoamilico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm. En un tubo limpio se colocó la fase superior y se le agregó 90 μ l de NaCl 1 M y 3 ml de etanol absoluto a -20 °C.

.- Se agitó suavemente hasta que las hebras de DNA se hicieron evidentes y el DNA se extrajo de la solución con una pipeta Pasteur sellada. Se secó por unos minutos a temperatura ambiente, se enjuagó en etanol a -20 °C, se dejó secar a temperatura ambiente una vez más y se resuspendió en 200 μ l de agua destilada estéril.

CUANTIFICACION DEL DNA

Para cuantificarlo se diluyó 1 μ l de la muestra de DNA en 250 μ l de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda (λ) de 260 nm el dato así obtenido se aplicó en la siguiente formula (Maniatis y Sambrook, 1989):

$$(D.O) (F) (\text{dil}) = [\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Donde :

D.O.₂₆₀ = densidad óptica a una λ de 260 nm

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D.O.₂₆₀)

dil = volumen de dilución equivalente a 250 μ l

Después de la extracción del DNA se comprobó su integridad por medio de una electroforesis (fig. 12), para lo cual se mezcló 1µl de muestra con 2µl de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05% : 0.05%) y 5µl de agua estéril y se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio por 20 minutos a 100 volts.

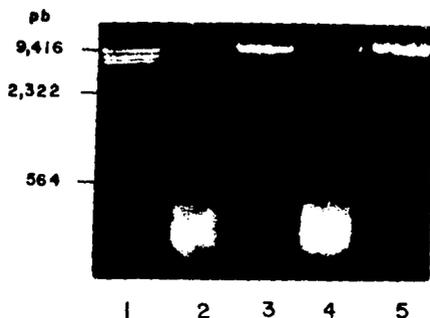


Figura 12.- Integridad del DNA. Carril 1: marcador de pesos moleculares λ Hind III; carriles 2 y 4: DNA íntegro; carriles 3 y 5: DNA degradado; notese que el DNA íntegro se encuentra concentrado en una sola banda gruesa, nítida y además, su corrimiento electroforético corresponde al del DNA de 23,130 pb del marcador de pesos moleculares mientras que en el DNA degradado se puede observar un barrido con una serie de bandas.

Una vez que se cuantificó y confirmó la integridad del DNA, se sintetizaron los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los exones 3, 4 y 5 del gen RB de acuerdo con las secuencias diseñadas por Blanquet y cols (1993) siguiendo el procedimiento propuesto por Pharmacia LKB (1991).

Síntesis de Oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleótidos es un acoplamiento cíclico de monómeros (A,T,G,C), para obtener un multímero de una longitud y una secuencia previamente determinadas (fig. 13). Cada síntesis comprende una serie de ciclos, en cada uno de los cuales se agrega un nucleótido a la cadena en crecimiento (Pharmacia LKB). La reacción consta de cuatro pasos principales, y se desarrolla sobre un polímero inerte (soporte sólido) en el cual se ensambla el oligonucleótido mediante una adhesión sucesiva de nucleótidos libres; el primer 3' nucleósido (A, C, T o G) se ancla a este soporte mediante un puente de succinato, el proceso se inicia lavando el soporte sólido que contiene el monómero inicial con dicloroetano y después se suceden en forma continua los siguientes pasos (fig. 14):

- 1.- Desprotección del grupo 5-hidroxilo de la unidad terminal 2-deoxirribosa, removiendo el grupo 4,4'-dimetiltritol (DMTr) con dicloroetano, después se eliminan los residuos de agua con acetonitrilo.
- 2.- Acoplamiento: formación de un puente 3'-5' internucleotídico con el grupo fosfato del deoxirribonucleótido siguiente.
- 3.- Capping: se bloquean los grupos hidroxilo sin reaccionar para garantizar que sólo se polimerice la secuencia correcta en los ciclos siguientes.
- 4.- Oxidación: se oxida el puente de triéster fosfato y se detiene la reacción.

Cada síntesis comprende una serie de ciclos en cada uno de los cuales, se agrega un nucleótido a la cadena en crecimiento, básicamente se compone de las siguientes reacciones químicas orgánicas:

Capping: Bloqueo de grupos hidroxilo sin reaccionar para evitar la acumulación de secuencias equivocadas.

Corte: Eliminación del oligonucleótido sintetizado del soporte sólido en un proceso postsíntesis.

Acoplamiento: Reacción de condensación entre los nucleótidos.

Desprotección: Eliminación de los grupos de protección del oligonucleótido con amonio en un proceso postsíntesis.

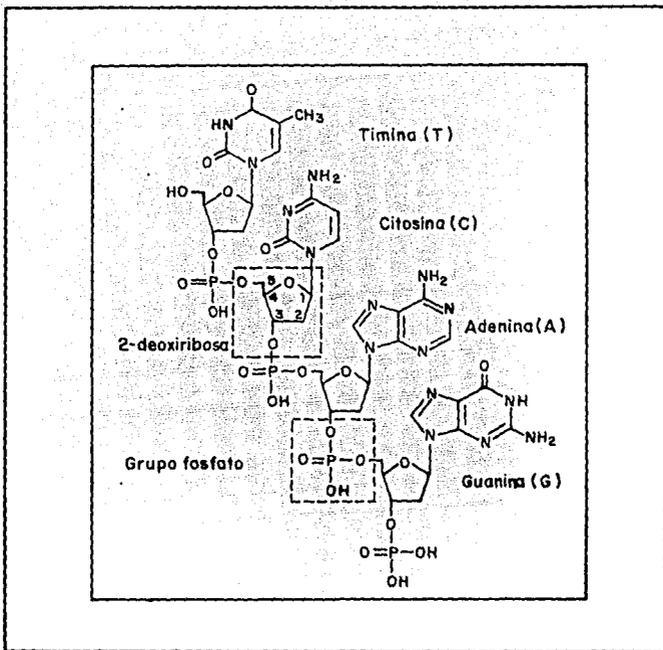
Oxidación: Oxidación del triéster fosfito a triéster fosfato para detener el ciclo de reacción.

Purificación: Empleo de columnas de intercambio iónico o de sephadex para remover subproductos del oligonucleótido sintetizado.

Para este trabajo se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes a los exones 3, 4 y 5 del gen RB de acuerdo con las secuencias diseñadas por Blanquet y cols., (1993):

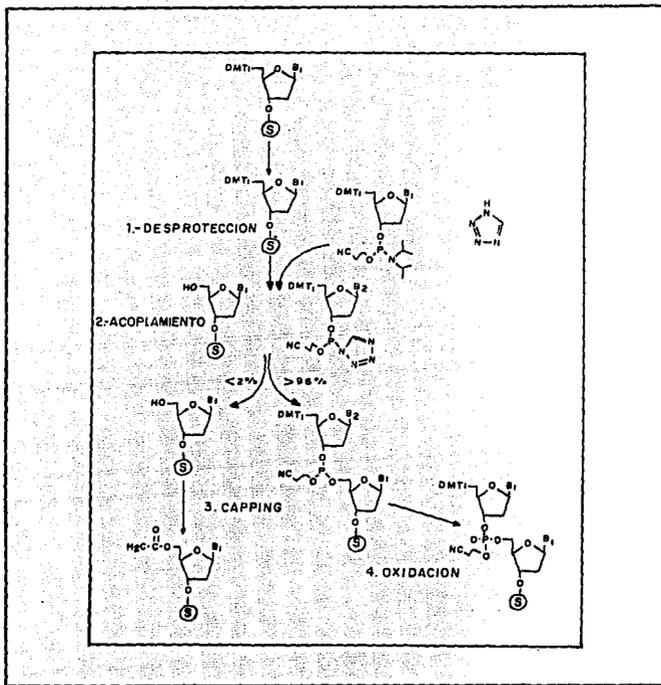
Exón	Secuencia de Oligonucleótidos	Amplificado (pb)
3	R 5' CAGTTTAAACATAGTATCCA 3' F 5' ATACACTTTCATAACGGCTC 3'	397
4	R 5' AGTAGTGATTTGATGTAGAG 3' F 5' TGAGCTAACATTA AAAAGGGA 3'	411
5	R 5' C TACTATGACTTCTAAATTCG 3' F 5' CAAGATGTTTGAGATTATTCC 3'	200

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR fueron diseñados de acuerdo con las secuencias de las cadenas sencillas que flanquean los extremos de los exones del gen RB por lo que con ellos pueden analizarse tanto los sitios de exición como toda la secuencia codificadora de cada uno de los exones. La longitud de la región intrónica que flanquea los exones varía de 58 a 320 pb entre los exones 3, 4 y 5 (Blanquet, 1993).



(Pharmacia LKB, 1991)

Figura 13.- SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS. La síntesis de oligonucleótidos es básicamente una condensación entre el grupo 5'-hidroxilo de un nucleótido con el grupo 3' fosfato de un segundo nucleótido.



(Pharmacia LKB, 1991)

Figura 14.- FASES DE LA SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS.

Este proceso se repite hasta que la secuencia de nucleótidos requerida ha sido sintetizada.

AMPLIFICACION POR PCR

Para amplificar el DNA genómico se mezclaron los reactivos de la *tabla 2* en el orden indicado, y se sometieron al proceso de amplificación en un termociclador (Perkin Elmer; Gene Amp 9600) con el siguiente programa:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
a)	94°C	2 min	1
a)	94°C	20 seg.	30
b)	55°C	20 seg.	
c)	72°C	30 seg.	
a)	94°C	12 seg.	1
b)	65°C	20 seg.	
c)	72°C	7 min.	
d)	4°C	Indefinido	

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización
- d) Terminación

Después de concluida la amplificación, ésta se verificó colocando 1 μ l del amplificado en un gel de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio y se sometió a electroforesis a 85 V durante 1 h. Posteriormente se observó el DNA en un transiluminador de luz U.V. sobre el cual se tomó la fotografía correspondiente (*figuras 15 - 17*).

TABLA 2.- CONDICIONES PARA PCR

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
H ₂ O	14.67 μ l		
Buffer taq.	2.70 μ l	10 X	1 X
ATGC	0.55 μ l	10 mM α	1.00 mM α
Oligonucleótido F	0.89 μ l *	100 ng/ μ l	3.5 ng/ μ l
Oligonucleótido R	0.89 μ l *	100 ng/ μ l	3.5 ng/ μ l
Taq Polimerasa Stoffel	0.30 μ l	10 U/ μ l	0.12 U/ μ l
MgCl ₂	4.00 μ l	25 mM	4.00 mM
<u>DNA</u>	<u>100.00 ng/μl</u>		
Volúmen final	25.00 μ l		

α la concentración es de 10 mM por cada una de las bases

* Se utilizaron con la misma concentración para el análisis de los tres exones.

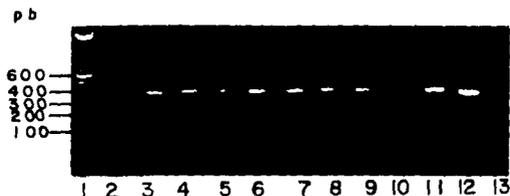


Figura 15.- Amplificación del exón 3. Se muestran cinco casos con RB bilateral, cinco casos con RB unilateral y un control negativo con la mezcla de reacción para PCR pero sin DNA. El tamaño del amplificado obtenido es de 397 pb. Carril 1: marcador de peso molecular ladder (Apendice 1); carril 2: RB103; carril 3: RB103; carril 4.-RB115; carril 5: RB202; carril 6: RB242; carril 7: RB288 carril 8: RB25; carril 9: RB260; carril 10: RB303; carril 11: RB316; carril 12: RB322; carril 13: control (-) con la mezcla de reacción en ausencia de DNA.



Figura 16.- Amplificación del exón 4. Se muestran diez casos con RB unilateral, el tamaño del amplificado es de 411 pb. Carril 1: marcador de peso molecular λ /Hind III (Apéndice 1) carril 2: RB85; carril 3: RB402; carril 4: RB405; carril 5: RB408; carril 6: RB409; carril 7: RB412; carril 8: RB415; carril 9: RB418; carril 10: RB427; carril 11: RB392.

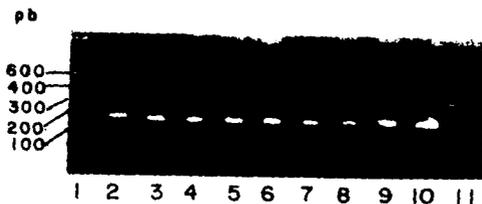


Figura 17.- Amplificación del Exón 5. Se muestran nueve casos con RB unilateral y un control negativo. El tamaño del amplificado es 197 pb. Carril 1: marcador de peso molecular ladder (Apendice 1); carril 2: RB85; carril 3: RB402; carril 4: RB405; carril 5: RB408; carril 6: RB409; carril 7: RB412; carril 8: RB415; carril 9: RB418; carril 10: RB427; carril 11: control (-) con la mezcla de reacción en ausencia de DNA.

Detección de mutaciones por análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla SSCP.

Procedimiento

Para detectar las mutaciones por SSCP, los amplificados obtenidos se reamplificaron nuevamente con el mismo programa de PCR pero esta vez en presencia de [α - 32 P]dCTP tal como se indica en la *tabla 3*. Posteriormente las moléculas obtenidas en esta reacción se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante como se indica a continuación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante

Una vez concluida la PCR en presencia de [α - 32 P]dCTP, se mezcló 1.5 μ l del amplificado con 9 μ l de colorante stop y se incubó por 10 minutos a 99 °C para desnaturizar el DNA. Inmediatamente después se colocó la mezcla en hielo frappé por 5 minutos y finalmente se corrieron 3 μ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida por 19 h a 150 V en buffer TBE 0.8 X.

Autorradiografía

Después de transcurrido este tiempo se colocó el gel en papel filtro y se cubrió con una película de Egapack, se secó a 80 °C en un sistema de vacío por 1 h y se montó en un cassette de foto exposición con dos placas Kodak O-matic. Las placas se revelaron en tiempos de 12 y 24 horas para poder ver la señal radioactiva que quedó impresa en las autorradiografías.

TABLA 3.- CONDICIONES PARA SSCP

Reactivo	Volumen	[Stock]	[Final]
H ₂ O	5.10 µl		
Buffer	1.00 µl	10 X	1 X
ATGC	0.20 µl	**	**
Oligonucleótido R	0.50 µl	100 ng/µl	5.00 ng/µl
Oligonucleótido F	0.50 µl	100 ng/µl	5.00 ng/µl
Taq Polimerasa Stoffel	0.10 µl	10 U/µl	0.10 u/µl
MgCl ₂	1.50 µl	25 mM	3.80 mM
[α- ³² P]dCTP	0.10 µl	2 mM	0.02 mM
<u>DNA amplificado</u>	<u>1.00 µl</u>		
Volúmen final	10.00 µl		

**En este paso las concentraciones de bases A, T, G y C para SSCP se modificaron de tal manera que en 1 µl de la concentración stock de la mezcla de nucleótidos, la adenina, la timina y la guanina (A,T,G) se encuentran a una concentración 25 mM y la citocina (C) se encuentra a una concentración 2.5 mM con el fin de facilitar la incorporación del nucleótido marcado [α-³²P]dCTP.

Densitometría

La densitometría se aplicó para analizar la intensidad de la señal radioactiva de las bandas del patrón electroforético en aquellos pacientes que presentaron alteraciones en el SSCP sugestivos de ser portadores de una delección. Para ello se colocaron las placas de autorradiografías obtenidas en el paso anterior en un densitómetro (Cliniscan 2), el cual mide la intensidad de las bandas en función de la cantidad de luz que puede atravesar por la zona de la autorradiografía donde se imprimió la radioactividad incorporada en el producto amplificado. Los datos se registraron en forma gráfica empleando como unidad el porcentaje de transmitancia de luz.

Estandarización de la técnica de secuenciación

Con el fin de caracterizar las mutaciones responsables del retinoblastoma en futuras investigaciones, se estandarizó la técnica de secuenciación de Sanger de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se amplificó el DNA de interés con las condiciones ya previamente establecidas mediante la técnica del PCR (*tabla 2*) y después se corrió el amplificado en un gel al 1.8% de agarosa de bajo punto de fusión en Buffer TAE 1 X a 110 V. El producto amplificado se extrajo del gel con NaI 6M y polvo de vidrio de la siguiente manera:

Extracción de DNA de geles de agarosa con polvo de vidrio

- 1.- Se cortó la banda de interés del gel y se depositó en un baño de hielo.
- 2.- Se agregaron 800µl de NaI 6M a cada pedazo de gel, se incubó a 55 °C y se agitó en vortex hasta fundir la agarosa. Después se colocó nuevamente en hielo por 1 minuto.
- 3.- Se agregaron 45µl de suspensión de polvo de vidrio y se agitó con vórtex, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos, se retiró el sobrenadante por vacío con pipeta Pasteur y la pastilla de polvo de vidrio obtenida se enjuagó tres veces con solución de lavado (etanol 70%-NaCl 1M) fría y se eliminó el sobrenadante.
- 4.- Se eluyó el DNA con 40µl de agua estéril a 55 °C y agitación con vórtex y se incubó 20 minutos a 55 °C. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.
- 5.- Con ayuda de un concentrador (centrivap) se secó el DNA contenido en el sobrenadante y se guardó a -20°C

Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 1.- El fragmento de DNA de doble cadena se desnaturalizó a 93 °C durante 10 minutos.
- 2.- Se preparó la siguiente mezcla de reactivos:

DNA amplificado	7	μl
Buffer de reacción	2	μl
Oligonucleótido	1	μl
<hr/>		
Total	10	μl

Se calentó la mezcla por 2 minutos a 65 °C, se enfrió lentamente a menos de 35 °C de 15 a 30 minutos y se colocó el tubo de reacción en hielo.

- 3.- Mientras se enfriaba a 35 °C, se depositaron por separado 2.5 μl de cada dideoxinucleótido de terminación en un tubo de reacción:

ddG 2.5 μl (tubo 1)	ddA 2.5 μl (tubo 3)
ddT 2.5 μl (tubo 2)	ddC 2.5 μl (tubo 4)

- 4.- Se diluyó la Mezcla de bases de la siguiente manera:

Mezcla de bases	2 μl
H ₂ O	8 μl

- 5.- Se calentaron los tubos de terminación del paso 3 a 37 °C.
- 6.- Se preparó la reacción de marcaje radioactivo con [³⁵S]dATP, para tal efecto, a la mezcla del paso dos se le agregaron los siguientes reactivos:

Ditiotreitol 0.1M	1.0	μl
[³⁵ S]dATP	0.5	μl
DNA Polimerasa	2.0	μl

Se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos.

7.- Reacción de terminación. Se colocaron 3.5 μ l de la reacción del paso anterior en cada uno de los cuatro tubos del paso 3 (ddG, ddA, ddT y ddC), se mezclaron y se continuó la incubación por 5 minutos a 37 °C.

8.- Se detuvo la reacción agregando 4 μ l de colorante stop y,

9.- Se calentaron las muestras a 75 °C por dos minutos inmediatamente después se colocaron 3 μ l de cada reacción en el gel para secuenciación y se corrieron las muestras a 2,000 V durante 6 h. Transcurrido este tiempo se retiró el gel de la misma manera que con los geles de SSCP y se fijó con ácido acético glacial por 15 minutos para retirar el glicerol contenido en el gel y después se eliminó el ácido acético con un poco de agua y se secó el gel de la misma manera que los geles de SSCP, se colocaron dos placas para autorradiografía y se revelaron a las 24 y 48 h (*fig. 18*).

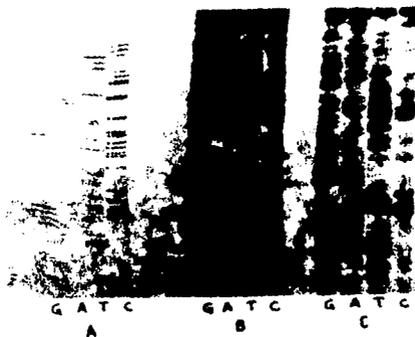


Figura 18.- AUTORRADIOGRAFIA DE SECUENCIACION. A: M13; B y C: DNA de un control normal, son secuencias complementarias. La técnica de secuenciación se estandarizó con el DNA del fago M13 (Apendice 1) como control interno del experimento y el DNA de un control normal.

RESULTADOS

HALLAZGOS CLINICOS

En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) el retinoblastoma ocupa la quinta causa de morbilidad infantil por padecimientos oncológicos. Tomando en cuenta que la probabilidad que tiene un individuo con RB hereditario para procrear descendencia afectada es del 50% (Carnevale y Del Castillo, 1993), que la probabilidad para desarrollar otras neoplasias es elevada y que clínicamente no es posible distinguir el retinoblastoma unilateral hereditario del no hereditario, las metodologías desarrolladas en este trabajo revelaron los siguientes resultados:

Aspectos clínicos

En este trabajo se estudiaron 40 pacientes con RB de los cuales, el 70% fueron unilaterales y el 30% bilaterales, en todos los casos fue necesaria la enucleación de por lo menos un ojo. El órgano afectado se envió a patología para su estudio. El principal motivo de la consulta fue la leucocoria en el 69.3% de los casos; estrabismo en un 17.9% y 12.8% fueron otras causas (tabla 4). La edad de inicio de los síntomas fue generalmente antes de los 5 años de edad. En la mayoría de los niños con RB bilateral este se manifestó antes de los seis meses de edad, y el 64% de los pacientes con RB unilateral presentaron el padecimiento antes del año de edad (tabla 5).

**TABLA 4.- DATOS OCULARES EN PACIENTES CON
RETINOBLASTOMA**

Signos	Motivo de la Consulta		N° (%)
	RB Unilateral N°	RB Bilateral * N°	
Leucocoria	19	8	69.3
Estrabismo	6	1	17.9
Otros	3	2	12.8
Total	28	11	100

m = meses, a = años

* En esta tabla no se incluyen los datos de un paciente con RB bilateral del cual se desconoce la edad de inicio del padecimiento y el principal motivo de la consulta, el porcentaje se obtuvo en base a una n = 39.

TABLA 5.- EDAD DE INICIO DEL PADECIMIENTO

Edad de inicio	RB Unilateral	RB Bilateral *	(%)
0 - 6 m	11	8	48.8
7 - 12 m	7	2	25.6
13 m - 5 a	9	1	23.1
> 5 a	1	0	2.5
Total	28	11	100

m = meses, a = años

* En esta tabla no se incluyen los datos de un paciente con RB bilateral del cual se desconoce la edad de inicio del padecimiento y el principal motivo de la consulta, el porcentaje se obtuvo en base a una n = 39.

Neoplasias asociadas con RB en los pacientes estudiados

De los 40 pacientes analizados en este trabajo se encontraron dos casos con RB bilateral que presentaron metástasis, uno de ellos en la tibia izquierda y otro en el húmero izquierdo; en ambos casos la metástasis se manifestó en etapas posteriores a la enucleación del primer ojo y aún después del tratamiento con quimio y radioterapia para el tratamiento del segundo ojo. También se encontró un caso con RB unilateral que desarrolló metástasis en el sistema nervioso central después de que se enucleó el ojo afectado. Por otro lado se encontraron seis casos con RB unilateral y tres con RB bilateral con antecedentes familiares de tipo oncológico, figurando como principales neoplasias las del tipo pulmonar, cervico-uterinas, broncogénicas, gástricas, mamarias y testiculares. Los casos de cáncer testicular se encontraron principalmente en los padres de los pacientes, el resto de las neoplasias se registraron en los abuelos de los pacientes.

Población de estudio

La población captada para este estudio se compone de un total de 40 individuos (*tabla 6*) de los cuales 28 padecen RB unilateral y 12 RB bilateral; de los 28 con RB unilateral 13 son hombres y 15 son mujeres; mientras que de los 12 casos con RB bilateral, 8 son hombres y 4 son mujeres.

TABLA 6.- POBLACION DE ESTUDIO

Pacientes	Muestras	Unilateral		Bilateral
		Izquierdo	Derecho	
Hombres	21	4	9	8
Mujeres	19	7	8	4
TOTAL	40	11	17	12

CREACION DE UN BANCO DE DNA

Se creó un banco de DNA de todos los pacientes y de sus familiares de primer grado sumando un total de 116 individuos (*tabla 7*).

El DNA se obtuvo a partir de sangre periférica por el método descrito anteriormente en la metodología, en todos los casos la concentración del DNA fue mayor de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se consideró como criterio de pureza el cociente mayor a 1.6 obtenido al dividir la densidad óptica (D.O.) con λ de 240 nm que detecta el fenol contaminante y de 280 nm correspondiente a las proteínas. Posteriormente se valoró la integridad del DNA en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se consideró como patrón óptimo de integridad cuando el DNA se observó concentrado en una sola banda fluorescente de alto peso molecular, gruesa y nítida (*fig. 12*).

TABLA 7.- BANCO DE DNA

DNA de pacientes	40
DNA de familiares 1 ^{er} grado	76 *

TOTAL	116
--------------	------------

* - Se obtuvo la muestra de los familiares de primer grado que acudieron al INP.

DETECCION DE MUTACIONES POR PCR y SSCP.

Después de la creación del banco de DNA se establecieron las condiciones óptimas para amplificar los exones 3, 4 y 5 del gen RB. Para la estandarización de este procedimiento se probaron varias concentraciones de los diferentes reactivos utilizados como el Mg, Ca, oligonucleótidos, DNA, temperaturas y número de ciclos. En la *tabla 2* se muestran las condiciones que resultaron óptimas para la amplificación de estos exones. Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la sección de síntesis de oligonucleótidos. Se analizaron en total 40 muestras donde el producto obtenido de la amplificación para el exón 3 fue un fragmento de 397 pb (*fig. 15*), para el exón 4 de 411 pb (*fig.16*) y para el exón 5 de 200 pb (*fig. 17*). El análisis de los pacientes mostró que los fragmentos obtenidos por la PCR fueron del tamaño esperado y no presentaron variaciones en la migración ni bandas accesorias, por lo que con esta metodología no fue posible detectar mutaciones.

Estandarización de la técnica de SSCP

La técnica se estandarizó primero con muestras de individuos normales y al igual que en la técnica de PCR se optimizaron las condiciones para el análisis de exones. En la *tabla 3* se muestran las condiciones óptimas para el SSCP. Como control positivo para determinar si el SSCP es útil para detectar mutaciones puntuales se realizó el análisis de SSCP de un fragmento del gen FQ que codifica para la proteína reguladora de la conducción transmembranal. Dicho fragmento presenta la mutación puntual 2055 del 9→A en el exón 13 que fue determinada previamente en el laboratorio por la técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR. En la *figura 19* se muestra el análisis por SSCP de un grupo de pacientes sin la mutación y un paciente que porta la mutación 2055 del 9→A.

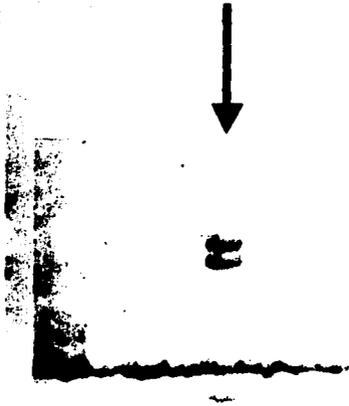


Figura 19.- SSCP del gen FQ con una mutación puntual. La flecha señala la mutación puntual 2055 del G→A en el exón 13 del gen FQ de un paciente afectado con fibrosis quística; en la figura el resto de los pacientes no tienen la mutación.

DETECCION DE MUTACIONES EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el SSCP, se analizaron los exones 3, 4 y 5 del gen supresor del retinoblastoma en 12 casos con RB bilateral (*tabla 8*) y 28 con RB unilateral (*tabla 9*). En este análisis se encontraron 2 pacientes con RB bilateral (pacientes RB272 y RB103 *figuras 20 y 21*) con alteraciones en el exón 3; 5 pacientes con RB unilateral (RB175, RB28, RB289, RB351 y RB333) y 2 con RB bilateral (RB267 y RB242) con alteraciones en el exón 4 (*figs. 22 - 26*), y 2 pacientes con RB bilateral (RB 164 y RB115) con alteraciones en el exón 5 (*figs. 27 y 28*). Es importante resaltar que en el paciente RB289 (*fig. 23*) no se presentaron bandas accesorias, sin embargo una de las bandas fue de menor intensidad que en el resto de los pacientes. Se realizó un análisis por densitometría del patrón electroforético de este paciente (*fig. 29*) y se comparó con el del paciente RB28 que presentó una banda accesoria en la fracción 2 (*fig. 30*) y con el de un control normal (*fig. 31*). De las 3 muestras se analizaron las 4 bandas que constituyen el patrón de SSCP para el exón 4 y se calculó el valor de cada una de las curvas obtenidas. El análisis comparativo de las fracciones mostró que tanto el control como el paciente RB28 guardaron una gran similitud entre cada uno de los valores obtenidos de sus 4 fracciones, correspondiéndoles un valor de 39.6% a la fracción 4 del control y de 41.7% a la del caso RB28. Estos resultados contrastaron notablemente con el 14.9% de la fracción 4 del paciente RB289. Este hallazgo parece ser el resultado de una delección, por lo que es posible que sólo se conserve la mitad de la dosis génica en este exón. Es importante resaltar que en el análisis densitométrico el paciente RB28 presentó un desplazamiento de la fracción 2, producto de la presencia de la banda aberrante (*figs. 23 y 30*).

TABLA 8.- POBLACION AFECTADA CON RB BILATERAL

Paciente	Sexo	Exones		
		3	4	5
RB103	F	*	N	N
RB202	F	N	N	N
RB242	F	N	*	N
RB288	F	N	N	N
RB115	M	N	N	*
RB319	M	N	N	N
RB334	M	N	N	N
RB330	M	N	N	N
RB164	M	N	N	*
RB272	M	*	N	N
RB267	M	N	*	N
RB392	M	N	N	N

N : Normal

*** : Mutado**

TABLA 9.- POBLACION AFECTADA CON RB UNILATERAL

Paciente	Sexo	Localización	Exones		
			3	4	5
RB260	F	Izq.	N	N	N
RB303	F	Izq.	N	N	N
RB333	F	Izq.	N	*	N
RB341	F	Der.	N	N	N
RB351	F	Der.	N	*	N
RB175	F	Der.	N	*	N
RB189	F	Izq.	N	N	N
RB402	F	Der.	N	N	N
RB405	F	Der.	N	N	N
RB409	F	Der.	N	N	N
RB418	F	Der.	N	N	N
RB427	F	Izq.	N	N	N
RB477	F	Izq.	N	N	N
RB478	F	Izq.	N	N	N
RB496	F	Der.	N	N	N
RB316	M	Izq.	N	N	N
RB322	M	Izq.	N	N	N
RB310	M	Der.	N	N	N
RB133	M	Der.	N	N	N
RB325	M	Der.	N	N	N
RB289	M	Der.	N	*	N
RB28	M	Der.	N	*	N
RB85	M	Der.	N	N	N
RB408	M	Der.	N	N	N
RB412	M	Izq.	N	N	N
RB415	M	Izq.	N	N	N
RB485	M	Der.	N	N	N
RB494	M	Der.	N	N	N

N : Normal

* : Mutado

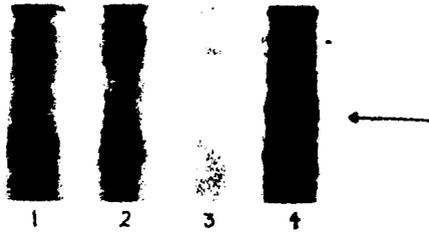


Figura 20.- Caso RB272. Carril 1: control; carril 2: RB320; carril 3: RB164; carril 4: RB272. La flecha en indica la presencia de una banda extra en el patrón de SSCP del exón 3.

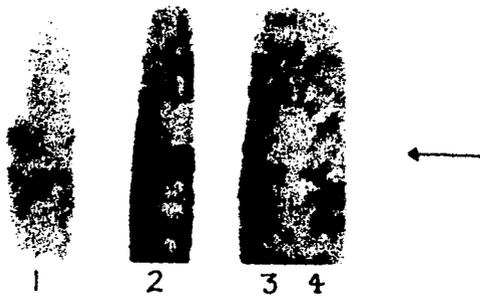


Figura 21.- Caso RB103. Carril 1: control de DNA de un individuo normal, carril 2: RB115; carril 3 y 4: RB103. La flecha indica la ausencia de una banda en el exón 3 de este paciente.

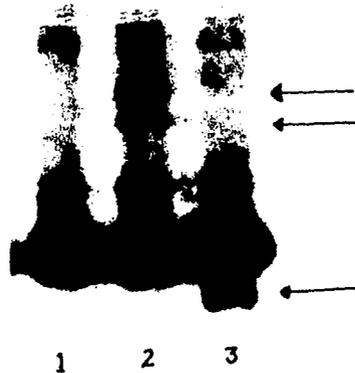


Figura 22.- Casos RB175 y RB267. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB175; carril 3: RB267; las flechas señalan dos bandas extra que se encontraron en el paciente RB175 que pueden ser el resultado de una estructura heteroduplex y una banda extra en el paciente RB267, ambos en el exón 4.

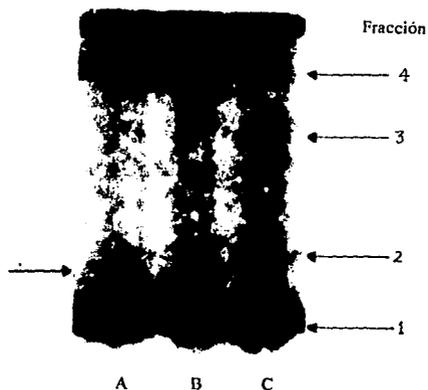


Figura 23.- Casos RB289 y RB28. Carril A: RB28; carril B: control de DNA de un individuo normal; carril C: RB289 con una clara diferencia en la intensidad de la señal en la fracción 4; la flecha de la izquierda indica la presencia de una banda extra en la fracción 2 en el exón 4 del caso RB28 carril A.

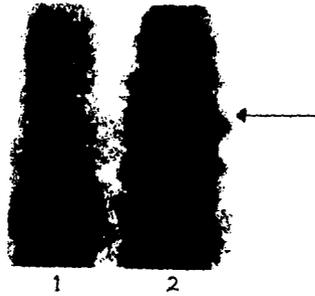


Figura 24.- Caso RB351. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB351; la flecha indica una banda anormal en el exón 4 de este paciente.

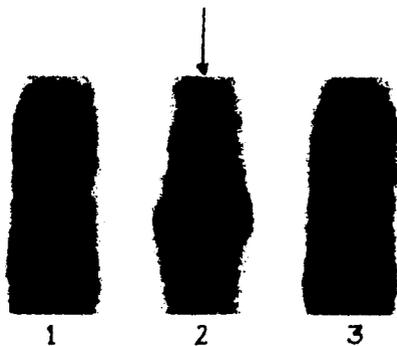


Figura 25.- Caso RB333, Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB333; carril 3: RB322; la flecha indica una banda extra en el exón 4 de este paciente.

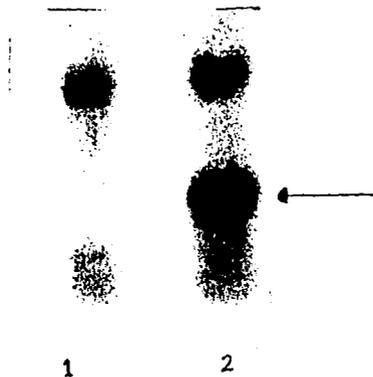


Figura 26.- Caso RB242. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB242; la flecha señala una banda extra en el exón 4 del paciente RB242.

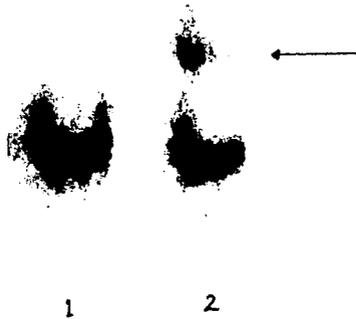


Figura 27.- Caso RB164. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB164; la flecha indica la presencia de una banda extra en el exón 5 de este paciente.

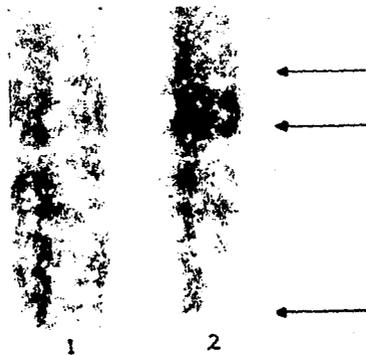


Fig. 28.- Caso RB115. Carril 1: control de DNA de un individuo normal, carril 2: RB115; la flecha indica la presencia de tres bandas extra en el exón 5 de este paciente.

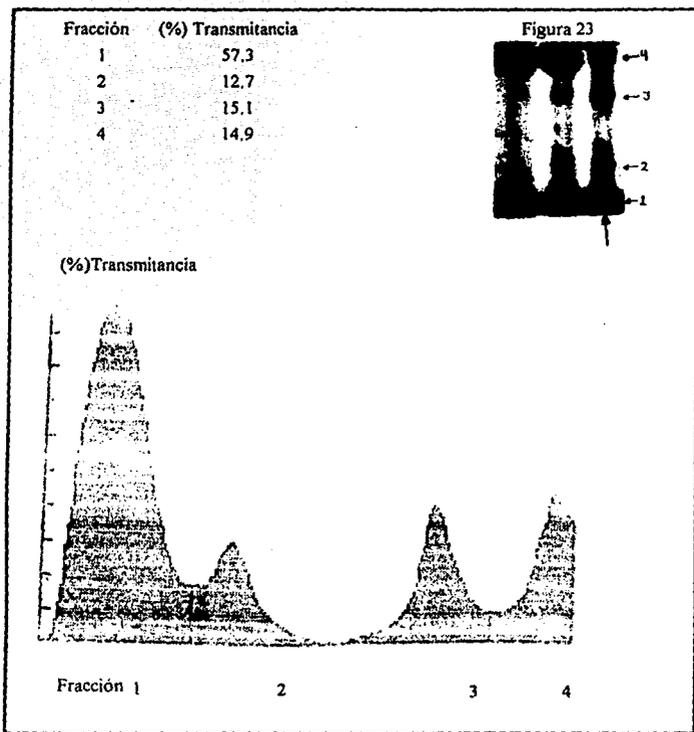


Figura 29.- Densitometría del caso RB289. Se muestran las curvas correspondientes a cada una de las cuatro fracciones que constituyen el patrón de SSCP en el análisis del exón 4. Nótese que existe relación entre el porcentaje de transmitancia, la forma de la curva y la intensidad de la señal radioactiva observable en el carril C de la figura 23. Compárese la fracción 4 del paciente RB289 con los datos correspondientes a la misma fracción del caso RB28 y del control en las figuras 30 y 31.

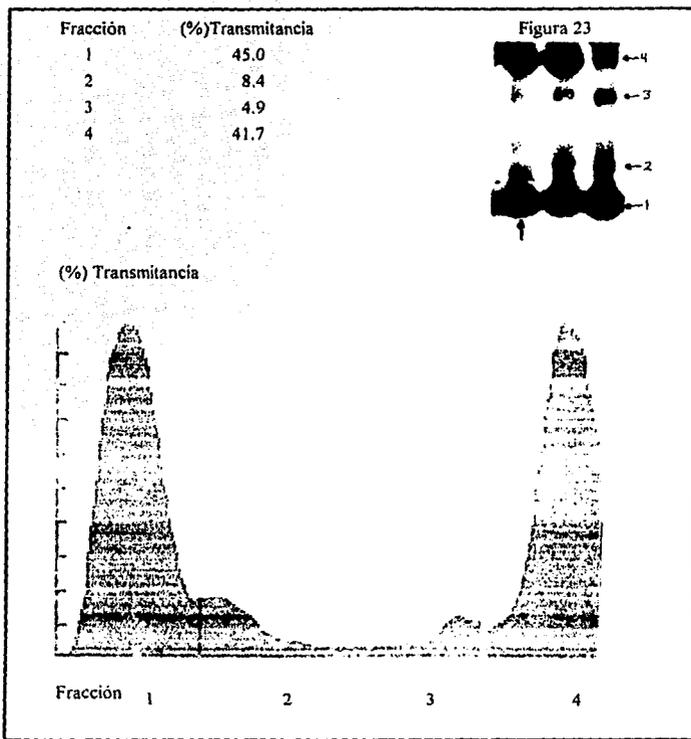


Figura 30.- Densitometría del caso RB28. Se muestran las curvas correspondientes a cada una de las cuatro fracciones que constituyen el patrón de SSCP en el análisis del exón 4. Nótese la relación que existe entre el porcentaje de transmitancia, la forma de la curva y la intensidad de la señal radioactiva observable en el carril A de la figura 23

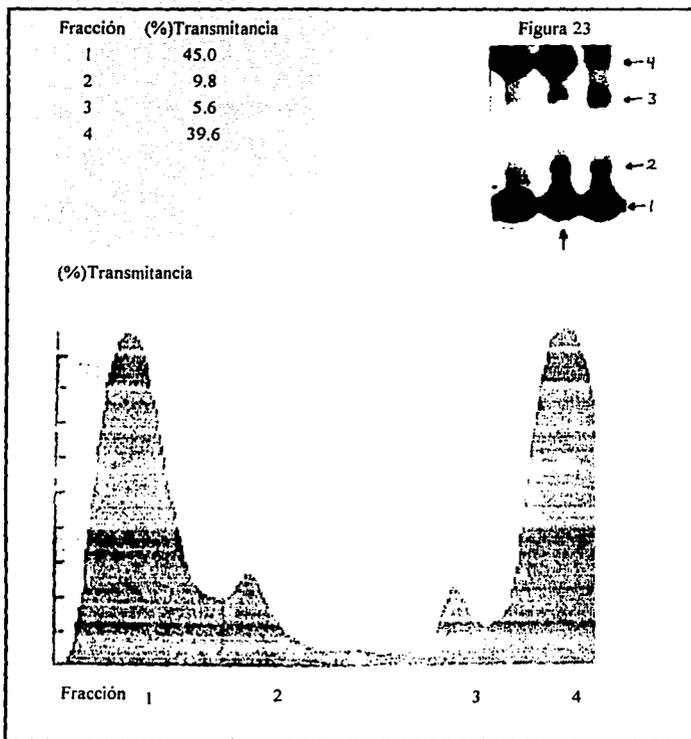


Figura 31.- Densitometría del control. Se muestran las curvas correspondientes a cada una de las cuatro fracciones que constituyen el patrón de SSCP. Nótese la relación que existe entre el porcentaje de transmitancia, la forma de la curva y la intensidad de la señal radioactiva observable en el carril B de la figura 23.

Otro resultado interesante fue el hallazgo de bandas de migración lenta en el patrón electroforético de los pacientes RB175 y RB 115 (figs. 22 y 28) que sugieren la presencia de deleciones o de inserciones pequeñas que permiten la formación de estructuras heteroduplex, las cuales son el producto del aparcamiento de una cadena normal con una mutada y que se observa en una electroforesis cuando la deleción o la inserción es mayor de 2 pb.

En el resto de los pacientes se encontraron bandas accesorias únicas que pueden ser el resultado de mutaciones pequeñas y/o puntuales. Considerando que en los trastornos autosómicos dominantes los hijos tienen una probabilidad del 50 % de heredar de sus padres el gen mutante (Carnevale, 1993), y que el retinoblastoma tiene una penetrancia del 90%, se analizaron las muestras de los padres de los pacientes RB267, RB289 RB272, RB115, RB164 y RB175 para determinar si tales alteraciones fueron heredadas de los padres (en caso de no penetrancia), o si son mutaciones *de novo*. Este análisis sólo reveló la presencia de bandas normales en los padres con lo cual se deduce que tal alteración no fue heredada de estos y que probablemente se trate de mutaciones *de novo*; aunque no se puede descartar la posibilidad de un mosaicismo gonadal en los padres de los pacientes.

En las figuras 32 - 34 se muestra un grupo de casos índice y un control todos ellos con patrones normales de SSCP correspondientes a los exones 3, 4 y 5 respectivamente. En los pacientes con RB unilateral encontramos alteraciones sólo en el exón 4 (tabla 9) mientras que en los pacientes con RB bilateral las alteraciones se observaron en los tres exones analizados (tabla 8). Es importante señalar que la presencia de las mutaciones fue más frecuente en los casos con RB bilateral (7/12) que en el RB unilateral (5/28).

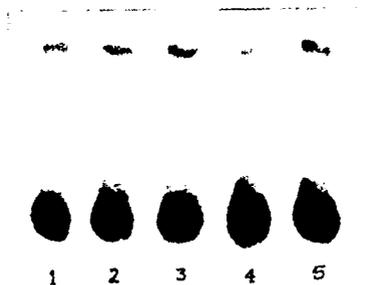


Figura 32.- Patrón normal de SSCP para el exón 3. Se muestra un grupo de pacientes afectados con RB. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB85; carril 3: RB402; carril 4: RB405; carril 5: RB408.



Figura 33.- Patrón normal de SSCP para el exón 4. Se muestra un grupo de pacientes afectados con RB. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB133; carril 3: RB341; carril 4: RB351; carril 5: RB133.

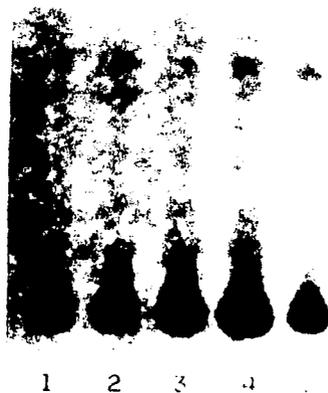


Figura 34.- Patrón normal de SSCP del exón 5. Se muestra un grupo de pacientes afectados con RB. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB310; carril 3: RB133; carril 4: RB325; carril 5: RB341.

DISCUSION

El retinoblastoma es una neoplasia maligna de origen embrionario que se presenta generalmente antes de los 5 años de edad con una frecuencia de 1 en 20,000 nacidos vivos. En el INP el retinoblastoma ocupa la quinta causa de morbilidad infantil por padecimientos oncológicos y sólo en un año se atendieron en el Servicio de Genética 29 casos nuevos.

Desde que el gen RB fue clonado en 1986, la mayoría de los rearrreglos cromosómicos reportados han sido alteraciones estructurales de tamaño considerable detectables por hibridación con Southern blot. En estos estudios se han encontrado solamente del 9 al 16% de las alteraciones responsables de la enfermedad (Horowitz y cols, 1989). Por otro lado solamente un pequeño número de pacientes con RB (\cong 5%) presentan deleciones cromosómicas lo suficientemente grandes para ser detectadas citogenéticamente (Gallie y Joremy, 1990). Considerando que casi todos los pacientes no relacionados entre sí tienen defectos moleculares diferentes (Blanquet y cols, 1991), es necesario aplicar métodos más eficientes para la detección de mutaciones pequeñas como el análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) el cual se aplicó a la población de estudio de este trabajo.

Del total de la población en estudio (*tabla 5*) el 30% presentó RB bilateral: 8 hombres y 4 mujeres, y el 70% RB unilateral: 13 hombres y 15 mujeres. En el 69.3% de los pacientes la leucocoria fue el signo más temprano que de acuerdo con la literatura es la principal manifestación del retinoblastoma, seguida en orden de importancia por el estrabismo que en este estudio lo presentó el 17.9% de los pacientes. El resto iniciaron sus manifestaciones clínicas con lagrimeo o inflamación ocular.

Con respecto a la edad de inicio de las manifestaciones clínicas, todos los casos con RB bilateral y el 50% con RB unilateral se presentaron antes del año de edad (tabla 4). De acuerdo con la literatura (Abramson, 1990) todos los RB bilaterales y el 10-15% de los RB unilaterales son hereditarios. Por otra parte se sabe que en estos casos el retinoblastoma se manifiesta antes del primer año de vida; mientras que el retinoblastoma no hereditario (85-90% de los RB unilaterales) se manifiesta más tardíamente. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos sugieren que en la población estudiada el RB unilateral hereditario podría presentarse con mayor frecuencia que lo reportado en la literatura o bien que estos sean casos en los que el desarrollo del tumor en el otro ojo se presente en etapas posteriores al estudio y que por lo tanto sean casos de RB bilateral.

Por otra parte, se ha reportado que una mutación germinal en el gen RB (forma hereditaria) predispone, además del retinoblastoma, a otro tipo de tumores primarios y más del 50% de estos pacientes desarrolla tumores no oculares, en los siguientes 32 años de vida, principalmente osteosarcoma, (Benedict y cols, 1990). En este trabajo, 2 de los pacientes con RB bilateral desarrollaron osteosarcoma, uno de ellos desarrolló el tumor en el húmero izquierdo a los 18 años de edad y el otro en la tibia izquierda a los 6 años. También se encontró un caso con RB unilateral que desarrolló un tumor en el sistema nervioso central a la edad de 16 años. No se encontraron otras neoplasias asociadas, sin embargo la mayoría de los pacientes son menores de 5 años, por lo que es posible que algunos de ellos posteriormente desarrollen tumores no oculares, por lo cual fue necesario advertir de estos riesgos a las familias afectadas.

El pronóstico del paciente con retinoblastoma depende del diagnóstico y del tratamiento oportuno; desafortunadamente el diagnóstico se establece en etapas avanzadas y el tratamiento es agresivo ya que generalmente

requiere de la enucleación del órgano afectado. En este estudio todos los pacientes fueron enucleados de por lo menos un ojo y requirieron de tratamiento con quimio y/o radioterapia.

Clínicamente no es posible diferenciar el RB unilateral hereditario del no hereditario por lo que es necesario establecer estrategias metodológicas para el diagnóstico diferencial entre el RB unilateral hereditario del no hereditario, ya que sería de gran utilidad para el tratamiento oportuno de la enfermedad y para otorgar un asesoramiento genético adecuado.

En el presente trabajo se analizaron 28 pacientes con RB unilateral y 12 con RB bilateral por SSCP; dicha técnica resultó ser de gran utilidad ya que se pudieron detectar mutaciones en 6 casos de los 12 con RB bilateral y en 5 casos de los 28 con RB unilateral, con lo cual se hace evidente la sensibilidad de la técnica para detectar mutaciones que por otros procedimientos comunes no pueden ser detectados. También es importante resaltar la ventaja que ofrece esta técnica para poder analizar simultáneamente un número considerable de muestras en un sólo evento.

Por otra parte, es muy importante resaltar que de los 28 pacientes con RB unilateral se encontraron 5 casos con alteraciones en el patrón electroforético, este es un resultado muy interesante ya que al haberse encontrado dichas alteraciones en el DNA de sangre periférica, se puede concluir que estos casos con RB unilateral son hereditarios ya que todos los casos con RB no hereditario presentan la mutación exclusivamente en las células de la retina tal como se establece en la teoría de Knudson (Abramson, 1990; Shimizu y cols, 1994).

Con respecto a los casos con RB bilateral, se encontraron 6 de un total de 12 casos analizados que presentaron alteraciones en el patrón electroforético, mientras que de los RB unilaterales sólo se encontraron 5

pacientes. Este resultado era de esperarse, ya que en los pacientes con RB bilateral las mutaciones se encuentran en todas las células del individuo afectado, en contraste con los casos con RB unilateral donde se esperaría que sólo del 10-15% de los pacientes presenten la mutación en todas sus células. Un hallazgo importante fue el hecho de que el 64% de los pacientes con RB unilateral manifestó el padecimiento antes del año de edad, y de estos el 61% antes de los 6 meses. Este es uno de los parámetros que caracteriza a los casos hereditarios, por lo que este hallazgo aunado al alto índice de mutaciones encontradas en los pacientes con RB unilateral sugiere que los casos hereditarios son más frecuentes en nuestra población. Para aclarar este punto se tendrá que realizar otros estudios en estos pacientes.

Se analizaron las muestras de 6 parejas de padres de los pacientes informativos y en ninguno de ellos se encontró alteración en los patrones electroforéticos analizados, por lo que estos resultados sugieren que las alteraciones encontradas en los pacientes son mutaciones *de novo* que de acuerdo con Blanquet y cols (1995) surgen como formas esporádicas en familias sin antecedentes familiares con retinoblastoma ya que ninguno de los padres es portador de dicha mutación en las células sanguíneas, por otro lado, se sugiere que los casos aquí reportados son hereditarios puesto que el estudio se realizó en sangre periférica donde es viable detectar los casos hereditarios ya que los no hereditarios sólo se pueden detectar en condiciones de homocigocidad en tejido tumoral y no en tejido sanguíneo.

Es de notarse que de los pacientes analizados en este trabajo se encontraron casos de gran interés; el paciente RB175 (*fig. 22*) que presentó dos bandas extra en el patrón correspondiente al exón 4RB, y el paciente RB115 (*fig. 28*) que presentó tres bandas extra en el patrón correspondiente al exón 5RB hacen sospechar que estos resultados son consecuencia de la formación de estructuras heteroduplex, las cuales pudieron originarse debido

a una delección o a una inserción en uno de los alelos, de tal manera que si cada una de las cadenas normales se renaturaliza con una cadena mutada se formarán estructuras heteroduplex (Orozco, 1993). Otro caso interesante es el del paciente RB289 que presenta el mismo patrón electroforético que el resto de la población (figs. 23 y 29) para el exón 4RB. Sin embargo una de las bandas fue de menor intensidad, por lo que se realizó un análisis densitométrico del patrón electroforético correspondiente a este paciente comparándolo con el del control normal y con el del paciente RB28; de las 3 muestras se analizaron las 4 bandas que constituyen el patrón de SSCP para el exón 4. El análisis comparativo de las curvas obtenidas de la densitometría tanto del paciente RB28 (fig. 30) como del control (fig. 31) mostró que guardan una gran similitud entre los valores correspondientes a 3 de sus cuatro fracciones, pero existe una marcada diferencia en la fracción cuatro del caso índice RB289 (fig. 29), correspondiendo un valor de 39.6% a la fracción 4 del control y de 41.7% a la del caso RB28; ambos porcentajes contrastan notablemente con el 14.9% de la fracción 4 del paciente RB289, por lo que es posible que esta diferencia entre el control y el caso índice RB289 sea causa de que falte la mitad de material genético en el exón 4 de este paciente, de tal manera que este paciente es portador de un alelo normal y puede ser portador de un alelo deletado en esta región. Estos resultados deberán ser corroborados posteriormente por secuenciación de los exones alterados para caracterizar con certeza las mutaciones responsables de la enfermedad.

Con respecto al resto de los pacientes que presentaron un patrón electroforético normal, es posible que la mutación se localice en regiones del gen no analizadas en este trabajo

Con base a lo antes expuesto, es obvia la utilidad de la aplicación del análisis de SSCP como un medio para el diagnóstico diferencial del

retinoblastoma hereditario del no hereditario. Así mismo, la aplicación de esta forma de diagnóstico molecular puede permitir la anticipación con clara ventaja al desarrollo de la enfermedad, aun cuando el individuo no haya nacido todavía, como sucedería si se aplicaran estos conocimientos para el diagnóstico prenatal de la enfermedad, lo cual sería de gran ayuda para el adecuado manejo de los individuos afectados ya que actualmente la enfermedad sólo es detectada cuando el paciente se encuentra en estados muy avanzados de la enfermedad y en la mayoría de los casos es necesaria la pérdida de por lo menos un ojo.

CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular por SSCP puede emplearse con éxito para localizar alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo del retinoblastoma y aplicarse eficientemente como una forma de diagnóstico diferencial entre el RB hereditario y el RB no hereditario.

Un análisis molecular completo de los 27 exones del gen RB ayudaría a caracterizar las diferentes mutaciones causantes de la enfermedad.

Este tipo de estrategias podrían aplicarse a un diagnóstico temprano que sería de gran utilidad para el tratamiento oportuno y un correcto asesoramiento genético tanto para los individuos afectados como para los individuos con alto riesgo de padecer la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

Abramson M. 1990. Retinoblastoma 1990: Diagnosis, treatment and implications. *Pediatr Ann* 19:387-395.

Ausubel F; Brent R. 1988. *Current protocols in Molecular Biology. Overview of DNA Sequencing Methods.* Greene Publishing Associates and Wiley- Interscience. New York. pp 12.8.9

Benedict W; Xu H; Hu S. 1990. Role of the Retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest* 85:988-993.

Blanquet V; Créau N; De Grouchy J. 1991. Molecular detection of constitutional deletions in patients with Retinoblastoma. *Am J Med Genet* 39:355-361.

Blanquet V; Turleau C; Gross M. 1993. Identification of germline mutations in the RB gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing; *Hum Mol Genet* 2:975-979.

Blanquet V; Gross M; Turleau C. 1994. Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the Retinoblastoma gene. *Hum. Mol. Genet* 3:1185-1186.

Blanquet V; Turleau C; Gross M. 1995. Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma; *Hum Mol Genet* 4:383-388.

Carnevale A; Del Castillo V. 1993. Herencia mendeliana en: "Genética y Biología Molecular en Cardiología". Sociedad Mexicana de Cardiología. México. pp. 51-71.

Cowell J. 1991. The Genetics of Retinoblastoma. *Br.J. Cancer* 63:333-336.

Danjan G; Dean M. 1993. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 2:404-414.

Danjan G, Dean M. 1995. A comparison of the sensitivity of the single-strand conformation polymorphism and heteroduplex methods; *Methods in neurosciences*, in press.

Diaz M, Orozco L. 1992. Estudio Clínico-Genético del Retinoblastoma. Boletín Médico Hospital Infantil de México 49:175-179.

Draper G; Sanders B; Kingston E. 1986. Second neoplasms in patients with retinoblastoma. Br J Cancer 53:661.

Dryja T; Rapaport J. 1986. Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. Proc Natl Acad Sci 83:7391-7394.

Dunn J; Phillips R; Becker A. 1988. Identification of germline and somatic mutations affecting the Retinoblastoma Gen. Science 241:1797-1800.

Friend S; Bernards R; Rogel S. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323:643-6.

Friend S; Horowitz J. 1987. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. Proc Natl Acad Sci 84:9059.

Fung Y; Murphree A. 1987. Structural evidence for the authenticity of the human Retinoblastoma gene. Science 236:1567-1661.

Gallie, L; Joremy A. 1990. Biology of disease. Mechanism of oncogenesis in Retinoblastoma. Lab Invest 62:175-179.

Greger V; Passarge E; Bernard H. 1990. Somatic Mosaicism in a Patient with Bilateral Retinoblastoma. Am J Hum Genet 46:1187-1193.

Hollingsworth R; Carmel E; Wen-Hwa L. 1993. Retinoblastoma protein and the cell cycle. Current Opinion in Genetics and Development. 3:55-62.

Horowitz J; Yandell D; Sango P. 1989. Point mutational inactivation of the Retinoblastoma Antioncogene. Science 243:937-940.

Huei J, Jiing K; Jin Y. 1988. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. Science 242:1563-1566.

Iwahana H; Orita M; Kanasawa H.1989. Detection of polymorphisms of human DNA gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci 86:2766-2770.

Jorgen H; Winther J; De Nully P.1990. Risk of non-ocular cancer in first degree relatives of Retinoblastoma patients. Hum Genet 85:283-287.

Knudson A.1971. Mutation and cancer: Statistical study of Retinoblastoma. J NIH Res 2:67-72.

Ludlow J; De Caprio J. Huang C.1989. SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the Retinoblastoma susceptibility gene product family. Cell 56:57-65.

Maniatis, T; Sambrook, J.1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. V11 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA pp 7.87

McGee T; Yandell D; Dryja T.1989. Structure and partial genomic sequence of the human Retinoblastoma susceptibility gene. Gene 80:119-128.

Metka R; Damjan G; Dean M.1995. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the Cystic Fribosis Gene Hum Mol Genetics. En prensa.

Mitchell C; Cowell J.1988. Molecular evidence that the esterase-D gene lies proximal to the retinoblastoma susceptibility locus in chromosome region 13q14. Hum Genet 81: 57-60.

Naumova A; Sapienza C.1994. The genetics of Retinoblastoma, revisted. Am J Hum Genet 54:264-273.

Orita M. Youichi S. Takao S. y Kenshi H. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5:874-879.

Orozco L.1993. *Biología molecular aplicada al estudio de las enfermedades hereditarias en: "Genética y Biología Molecular en Cardiología". Sociedad Mexicana de Cardiología. México. pp. 87-104.*

Pharmacia LKB, Biotechnology. 1991. *Gene Assembler Plus (80-2081-57) Users Manual.*

Poduslo S; Dean M; Kolch U.1991. *Detection High-Resolution polymorphisms in human coding loci by combining PCR and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Am J Hum Genet 49:106-111.*

Roarty J; Mclean J; Zimmerman L.1988. *Incidence of second neoplasms in patients with bilateral Retinoblastoma. Ophthalmology, 95:1583.*

Sanger F; Nicklen S; Coulson A.1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74:5463-5467.*

Scheffer H; te Herman G; Kruize Y.1989. *Linkage analysis of families with hereditary Retinoblastoma: Nonpenetrance of mutation, revealed by combined use of markers within and flanking the RB1 gene Am J Hum Genet 45:252-260.*

Shimizu T; Toguchida J; Kato M.1994. *Detection of mutations of the RB1 gene in Retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. Am J Hum Genet 54:793-800.*

Shirodkar S; Ewen M; DeCaprio J.1992. *The transcription Factor E2F Interacts with the Retinoblastoma Product and a p107-Cyclin A Complex in a Cell Cycle-Regulated Manner. Cell 68:157-166.*

Toguchida J; Ishisaki K; Sasaki M.1988. *Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of Retinoblastoma susceptibility gene in the development of Osteosarcoma. Cancer Res 48:3939-3943.*

Vaughan D; Taylor A. 1987. *Oftalmologia general. 8ª ed. Ed. El Manual moderno. México D.F. pp. 412-415.*

Weatherall D. 1991. "The new genetics and clinical practice" 3rd ed. Oxford University Press, Oxford. pp. 376.

Weinberg R. 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146.

Wiggs J; Nordenskjöld H; Yandell D. 1988. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *The New Engl J Med* 318:151-157.

Yandell D; Dryja T. 1989. Sequencing of alleles at the Human Retinoblastoma Locus: Application to Cancer Diagnosis and Genetic Counseling. en: "Molecular Diagnostics of Human Cancer". Cancer Cells. Cold Spring Harbor Laboratory, Massachusetts USA. pp.223-227

APENDICE I

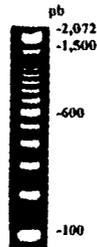
Marcadores de peso molecular

λ DNA/Hind III



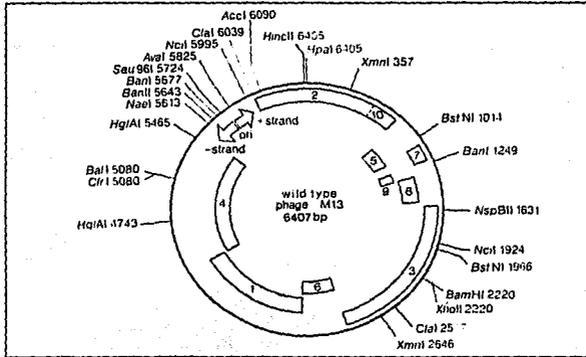
(Gibco BRL 15612-013) fragmentos óptimos para trabajar con DNA lineal de doble cadena, desde 125 pb hasta 23.1 kb. Obtenido por digestión del λ DNA con clindts 857, Sam 7 y Hind III. * Esta banda normalmente no se ve.

100 pb DNA ladder



(Gibco BRL 15628-019) fragmentos óptimos para trabajar con DNA lineal de doble cadena, desde 100 pb hasta 1500 pb. Obtenido de un plásmido que contiene secuencias aumentadas en 100 pb de forma creciente hasta 1500 pb y un fragmento adicional de 2072 pb.

Fago M13



El fago M13 tiene una doble cadena de 6407 pares de bases (Ausubel y Brent, 1988); debido a que contiene varios sitios de restricción es ampliamente utilizado como vector de transformación.

APENDICE 2

REACTIVOS

Reactivos para extracción de DNA de sangre periférica

- RCLB solución de lisis de células rojas
 - TRIS pH 7.5 10 mM
 - MgCl₂ 5 mM
 - NaCl 10 mM
- WCLB solución de lisis de células blancas
 - TRIS pH 7.6 10 mM
 - EDTA pH 8 10 mM
 - NaCl 50 mM
 - SDS 0.2 %
 - Proteinasa K 200 µg/ml
- Fenol Saturado:
 - H₂O estéril 200 ml
 - Fenol a 68 °C 300 ml
 - TRIS HCl pH 8 1M 4 ml
 - NaOH 10 M 293 µl

- Cloroformo
- Cloroformo- alcohol Isoamílico (24/1)
- Etanol absoluto
- NaCl 1M

Reactivos para PCR y SSCP

- Buffer Stoffel 10 X:
 - Tris-HCl 100 mM
 - KCl, pH 8.3 100 mM
- Mg Cl₂ 25 mM
- Taq. Polimerasa /Stoffel 10 U/µl
U = unidades: una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que incorpora 10 nmoles de dinucleótidos a 74 °C.
- Dinucleótidos: A, T, G y C, para PCR 10 mM c/u; para SSCP, A, T, y G, 25 mM c/u, C 2.5 mM.
- Secuencias específicas de oligonucleótidos del fragmento a amplificar 100 ng/µl.
- [γ -³²P]dCTP Actividad : 3000 µCi/mmol; Utilizado : 250 µCi

- H₂O bidestilada estéril
- Bromuro de etidio 5 µg/ml
- Buffer acarreador PCR:
 - Xilen-Cianol 0.05 %
 - Azul de bromofenol 0.05 %
- Buffer TBE 10 X
 - Tris-base 108 g
 - Acido bórico 55 g
 - EDTA 0.5 M pH 8.0 44 ml
- Colorante Stop (SSCP):
 - Formamida 95 %
 - Azul de bromofenol 0.05 %
 - Xilen-Cianol 0.05 %
- Agarosa grado electroforesis
- Poliacrilamida para geles de SSCP con gliceról 10%
 - Glicerol 25 ml
 - TBE 10 X 25 ml
 - H₂O 162 ml
 - Acrilamida 38 ml
 - Acrilamida 200 g
 - Agua estéril 300 ml
 - Bisacrilamida 6.7 g
- Persulfato de amonio 10 %
- TEMED reactivo
- Gel para SSCP
 - *Poliacrilamida con glicerol 10 % 60 ml
 - *TEMED reactivo concentrado 39 ml
 - *Persulfato de amonio 10 % 327 µl

*Se mezclan y la solución obtenida se coloca rápidamente en la cámara de electroforesis para SSCP sin que le queden burbujas de aire, se le deja polimerizar y se carga con las muestras que se quieren analizar, el corrimiento se realiza con buffer TBE .8 X

Reactivos para extracción con polvo de vidrio de DNA amplificado de geles de agarosa

- Agarosa de bajo punto de fusión
- NaI 6 M.

- Polvo de Vidrio Suspensión
- Solución de lavado (etanol 70%; NaCl 1M).
- H₂O estéril
- Buffer TAE 50 X pH 8.5

Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1 ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2 g

Reactivos para secuenciación

Sequenase Version 2.0 DNA sequencing Kit USB (70770) :

- Buffer de reacción (5x):

Tris-HCl. pH 7.5	200 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	250 mM

- Oligonucleótido para PCR: es específico del exón que se va a secuenciar.

- Didessoxinucleótidos de terminación:

ddG: 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddGTP, 50 mM NaCL.

ddA: 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddATP, 50 mM NaCL.

ddT: 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddTTP, 50 mM NaCL.

ddC: 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP, 8 μM ddCTP, 50 mM NaCL.

- Mezcla de bases (5 X):

dGTP 7.5 μM
dCTP 7.5 μM
dTTP 7.5 μM

- Ditiotritol (DTT) 0.1 M

- [α-³²S]dATP Actividad : 1000Ci/mmol; Utilizado : 250 μCi

- Colorante Stop:

Formamida	95 %
EDTA	20 mM
Azul de bromofenol	0.05 %

Xilen-Cianol 0.05 %

- DNA polimerasa 13 U/ μ l en:
 - K₂PO₄, pH 7.4 20 mM
 - DTT 1 mM
 - EDTA 0.1 mM
 - Glicerol 50 %

- Gel para secuenciación:

- Acrilamida 40% (38:2; Acrilamida:Bisacrilamida) 7.5 ml
- Urea 23 gr
- TBE 20 X 2 ml
- H₂O 22.5 ml
- Persulfato de amonio 10 % 125 μ l
- TEMED reactivo 25 μ l

Se mezclan, la acrilamida, Urea, TBE 20 X, H₂O y se filtran, después se agregan el persulfato de amonio y el TEMED. El corrimiento se efectúa con TBE 1 X.

- Acido acético glacial.
- Agarosa de bajo punto de fusión
- Bromuro de etidio 5 μ g/ml

MATERIAL Y EQUIPO

- Oligosintetizador Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB Biotechnology).
- Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Biotechnology).
- Campana de protección para radioisotopos (Labconco).
- Densitometro Cliniscan 2 (Helena labs.).
- Espectrofotometro Spectronic 1001 Plus (Milton Roy Field).
- Concentrador Centrivap (Labconco).
- Campana de extracción para gases (Labconco).
- Transiluminador (Fotodyne).
- Congelador -70 °C (Revco).
- Congelador -20 (American).

- .-Secador para geles Drygels (Hoffer Scientific Instruments).
- .-Termoblock (2050) (Labline).
- .-Camara de electroforesis para SSCP y Secuenciación Polar Beard (Owl scientific).
- .-Sistema de electroforesis submarina (Sigma Chemical Co.).
- .-Centrífuga clínica
- .-Fuente de poder 500 V (Hoffer Scientific Instruments).
- .-Fuente de poder 2000 V (Sigma Chemical Co.).
- .-Microcentrífuga (Fotodyne).
- .-Contador Gaiger
- .-Goggles para protección de ultravioletas
- .-Micropipetas: 0.5-10 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl.
- .-Pantallas de lucita para protección de radioisotopos
- .-Camaras de lucita para protección de radioisotopos
- .-Balanza analítica (Sartorius).
- .-Equipo de revelado automático
- .-Horno de microondas
- .-Cassettes para autorradiografías (Kodak O-matic)
- .-Placas para autorradiografías
- .-Camara fotografica (Fotodyne).
- .-Cristalería de laboratorio
- .-Puntas para pipetas y tubos eppendorf de plastico 0.6 ml y 1.5 ml
- .-Guantes de latex desechables